PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C12N 15/12, C07K 14/435, 16/18, 16/44, A61K 39/395, G01N 33/53

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 98/15625**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. April 1998 (16.04.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05314

(22) Internationales Anmeldedatum: 29. September 1997 (29.09.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 41 690.6	10. Oktober 1996 (10.10.96)	DE
197 04 024.1	4. Februar 1997 (04.02.97)	DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D–51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: HARDER, Achim [DE/DE]; Europaring 54, D–51109 Köln (DE). SCHERKENBECK, Jürgen [DE/DE]; Bechhausen 73, D–42929 Wermelskirchen (DE). JESCHKE, Peter [DE/DE]; Heymannstrasse 38, D–51373 Leverkusen (DE). WUNDERLICH, Frank [DE/DE]; Burgstrasse 31, D–41469 Neuss (DE). SCHMITT–WREDE, Hans–Peter [DE/DE]; An der Wolfskaul 18, D–41812 Erkelenz (DE). SAEGER, Beate [DE/DE]; Werstener Feld 48, D–40591 Düsseldorf (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D–51368 Leverkusen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: NEMATODE PROTEINS, DNA SEQUENCES CODING THEREFOR, THEIR SPECIFIC ANTIBODIES AND THEIR USE IN IDENTIFYING NEMATICIDAL ACTIVE SUBSTANCES

(54) Bezeichnung: NEMATODENPROTEINE, DAFÜR KODIERENDE DNA–SEQUENZEN, DAGEGEN SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER UND IHRE VERWENDUNG ZUM AUFFINDEN NEMATIZIDER WIRKSTOFFE

(57) Abstract

The present invention relates to proteins, as well as sections of said proteins, which react with active substances against parasitizing nematodes from the group of the cyclic or open–chain depsipetides consisting of amino acids and hydroxycarboxylic acids. The disclosure also comprises DNA sequences coding these proteins or sections of said proteins as well as the use of said proteins or their sections for identifying substances acting against parasitizing nematodes.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Proteine, sowie Teilstücke dieser Proteine, die mit gegen parasitierenden Nematoden wirkenden Soffen aus der Gruppe der cyclischen oder offenkettigen Depsipeptide, die aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren bestehen, reagieren, ferner DNA–Sequenzen, die für diese Proteine bzw. für Teilstücke dieser Proteine kodieren, sowie die Verwendung dieser Proteine oder ihrer Teilstücke zur Identifizierung von Stoffen mit Wirkung gegen parasitierende Nematoden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

NEMATODENPROTEINE, DAFÜR KODIERENDE DNA-SEQUENZEN, DAGEGEN SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER UND IHRE VERWENDUNG ZUM AUFFINDEN NEMATIZIDER WIRKSTOFFE

Die vorliegende Erfindung betrifft Proteine, sowie Teilstücke dieser Proteine, die mit gegen parasitierende Nematoden wirkenden Stoffen aus der Gruppe der cyclischen oder offenkettigen Depsipeptide, die aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren bestehen, reagieren, ferner DNA-Sequenzen die für diese Proteine bzw. für Teilstücke dieser Proteine kodieren sowie die Verwendung dieser Proteine oder ihrer Teilstücke zur Identifizierung von Stoffen mit Wirkung gegen parasitierende Nematoden.

Eine Reihe nematizider Substanzen werden bereits seit langem als Breitspektrum-Anthelmintika in der Tierzucht verwendet (z.B. Benzimidazole, Levamisol, Morantel oder Avermectinoide). Ausgehend von den genannten Substanzklassen führten zahlreiche Studien zur Aufklärung des Wirkmechanismus und zur Identifizierung des jeweiligen Bindungsproteins/Rezeptors (Benzimidazole: ß-Tubulin, Levamisol/Morantel: nikotinerger Acetylcholinrezeptor; Avermectinoide: Glutamat-vermittelter Chlorid-Kanal). Durch zunehmende Resistenz gegen diese Breitspektrum-Anthelmintika ist es wünschenswert neue anthelmintisch wirksame Stoffe zu entwickeln.

Ein cyclisches Depsipeptid PF 1022A und seine Wirkung gegen Endoparasiten ist bekannt (Y. Kodama et al., Sci. Reports of Meiji Seika Kaisha 31, 1992, S. 1-8; EP-OS 382 173 und EP-OS 503 538). Weitere cyclische Depsipeptide (Cyclooctadepsipeptide: WO 93/19053; EP-OS 634 408; WO 94/19334; WO 95/07272; EP-OS 626 375; EP-OS 626 376; EP-OS 664 297; Cyclohexadepsipeptide: WO 93/25543; WO 95/27498; EP-OS 658 551) und offenkettige Depsipeptide (EP-OS 657 171; EP-OS 657 172; EP-OS 657 173) und ihre endoparasitizide Wirkung sind bekannt.

Eine Reihe von Studien bezüglich der Aufklärung des Wirkungsmechanismus von PF 1022A in verschiedenen parasitären Nematoden, beispielsweise Angiostrongylus cantonensis, Haemonchus contortus, Ascaris suum, wurden durchgeführt (vgl. dazu M. Terada et al., Jpn. J. Parasitol. 42, 1993, S. 220-226; F.E. Dutton et al., J. Antibiotics 48, 1995, S. 820-823; E. Baldwin et al., J. Exp. Biol. 23, 1947, S. 277-91).

Außer den bereits genannten Breitspektrum-Anthelmintika (z.B. Benzimidazole, Levamisol, Morantel oder Avermectinoide) ist über ein Bindungsprotein bzw. Rezeptor in Nematoden von cyclischen oder offenkettigen Depsipeptiden als Liganden, bestehend aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren als Bausteine, insbesondere des cyclischen Depsipeptids PF 1022A, bisher nichts bekannt geworden.

Die vorliegende Erfindung betrifft Proteine, sowie Teilstücke dieser Proteine, die mit gegen parasitierende Nematoden wirkenden Stoffen aus der Gruppe der cyclischen oder offenkettigen Depsipeptide, die aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren bestehen, reagieren. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner DNA-Sequenzen die für diese Proteine bzw. für Teilstücke dieser Proteine kodieren.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung dieser Proteine oder ihrer Teilstücke zur Identifizierung von Stoffen mit Wirkung gegen parasitierende Nematoden aus der Gruppe der cyclischen oder offenkettigen Depsipeptide, die aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren bestehen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Identifizierung der Proteine und ihrer Teilstücke, sowie die Herstellung der Proteine oder ihrer Teilstücke über rekombinante Technologie.

Identifizierung und Charakterisierung der cDNA-Sequenzen, die für die erfindungsgemäßen Proteine kodieren, erfolgt durch Konstruktion einer statistisch. repräsentativen cDNA-Bibliothek unter Verwendung polyadenylierter RNA-Fraktionen, isoliert aus parasitären Nematoden und einem sich anschließenden Immunscreening der genannten cDNA-Bibliothek.

Identifizierung und Charakterisierung der erfindungsgemäßen cDNA-Sequenzen erfolgen mit Hilfe von Antikörpern gegen ein Konjugat, bestehend aus einem cyclischen oder offenkettigen Depsipeptid-Hapten und einem geeigneten Carrier-Protein.

Es sind bis jetzt nur monoklonale Antikörper gegen verschiedene Cyclodepsipeptid-Synthetasen, beispielsweise die Enniatin-Synthetase (A. Billich et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368 (5), 1987, S. 521-529; A. Lawen et al., J. Biol. Chem. 265, (19), 1990, S. 11355-11360) oder die Cyclosporin-Synthetase (A. Lawen et

al., J. Biol. Chem. 266, (24), 1991, S. 15567-15570), aber nicht spezifische Antikörper gegen Konjugate bestehend aus Depsipeptid-Hapten und einem geeigneten Carrier-Protein, bekannt geworden.

Bevorzugt zur Identifizierung und Charakterisierung der erfindungsgemäßen cDNA-Sequenzen werden Konjugate von PF 1022A oder seiner Derivate als Depsipeptid-Hapten an Carrier-Proteine eingesetzt.

Die erfindungsgemäßen Proteine werden durch Expression der erfindungsgemäßen cDNA in geeigneten Expressionssystemen, beispielsweise in Bakterien, insbesondere in *E. coli*, als prokaryotisches Expressionssystem oder in einem eukaryotischen Expressionssystem, insbesondere dem Baculovirussystem hergestellt.

Wirkstoffe die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Proteine aufgefunden werden, sind für die Medizin und Tiermedizin von hohem Interesse.

Weitere Aspekte der Erfindung und ihre bevorzugten Ausführungsformen sind im folgenden näher erläutert bzw. in den Patentansprüchen definiert.

Da es sich bei den offenkettigen und cyclischen Depsipeptiden, für die spezifische Antikörper entwickelt werden sollen, um relativ kleine und einfache Moleküle handelt, die nach der Applikation in ein Versuchstier alleine nicht in der Lage sind, dort eine entsprechende Immunantwort auszulösen, müssen vor der eigentlichen Immunisierung zunächst vorbereitende Maßnahmen getroffen werden (E. Harlow, D. Lane in; "Antibodies, a Laboratory Manual", Cold Springer Harbor Lab., Cold Spring Harbor, USA, 1988).

Man bezeichnet solche Verbindungen, die aufgrund ihrer Größe (Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 10.000 Dalton sind normalerweise schwache Immunogene; Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 2.000 Dalton können alleine kaum eine Immunantwort auslösen) und einfachen Strukturierung nicht zur Induktion einer Immunreaktion in der Lage sind, als Haptene oder inkomplette Antigene und stellt sie somit den kompletten Antigenen (= Immunogene) gegenüber, die sowohl als Antigen wirken als auch eine Immunantwort zu induzieren vermögen. Solche Haptenmoleküle können an meist lösliche, hochmolekulare Verbindungen (Trägermoleküle) konjugiert werden, wodurch sie in

ihren Eigenschaften kompletten Antigenen vergleichbar werden, d.h. sie besitzen jetzt die Fähigkeit zur Auslösung einer Immunantwort.

Einige der im Verlauf der Immunisierungsreaktion gebildeten Antikörper sind dann in der Lage, mit spezifischen Epitopen auf dem Haptenmolekül zu reagieren, unabhängig davon, ob das Haptenmolekül allein oder aber nach wie vor gekoppelt an das Carriermolekül vorliegt.

Bei der Immunisierung mit Hapten-Carrier-Konjugaten werden neben den Hapten-spezifischen Antikörpern auch solche induziert und gebildet, die gegen den Carrier oder das Bindeglied zwischen Carrier und Hapten, oder die nur gegen den Komplex aus Hapten-(Bindeglied)-Carrier gerichtet sind. Die spezifischen Anti-Hapten-Antikörper sind im Regelfall gegen denjenigen Teil des Moleküls gerichtet, der vom Carrier am weitesten entfernt ist.

Unter der im folgenden häufig verwendeten Bezeichnung Hapten werden im Rahmen der Erfindung die für die Immunisierung verwendeten offenkettigen oder cyclischen Depsipeptide, bevorzugt das Cyclodepsipeptid PF 1022A oder seine Derivate verstanden.

Im Rahmen dieser Erfindung werden daher die als Haptene wirkenden offenkettigen und cyclischen Depsipeptide, insbesondere PF 1022A oder seine Derivate, vor der Immunisierung von Versuchstieren, bevorzugt Nagetieren, wie z.B. Mäuse, Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen, an einen hochmolekularen Träger "Carrier" gekoppelt, der geeignet ist, besagten Depsipeptiden eine komplette Wirksamkeit zu verleihen.

Unter geeigneten Carrier-Molekülen im Rahmen dieser Erfindung sind in erster Linie makromolekulare Verbindungen zu verstehen, die frei zugängliche reaktive Gruppen für die Kupplungsreaktion mit dem Hapten aufweisen und die in der Lage sind, durch Kupplung an das Hapten, diesem eine immunogene Potenz zu verleihen oder aber deren bereits vorhandene Immunogenizität zu verstärken.

Besonders bevorzugte Carrier sind makromolekulare Verbindungen, die frei zugängliche reaktive Aminogruppen enthalten.

Ganz besonders bevorzugt als Carriermoleküle sind lysinreiche Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10.000 und 1.500.000, wie sie z.B. "Bovine Serum Albumin" (BSA: Molekulargewicht 66.200), "Humanes Serum Albumin" (HSA; Molekulargewicht: 58.000) oder "Keyhole Limpet Protein" (KLH; Molekulargewicht: 1.000.000). Diese sind kommerziell erhältlich.

Selbstverständlich können auch andere makromolekulare Verbindungen als Carrier-Moleküle verwendet werden, wie z.B. "Porcine Thyreoglobulin", B2 Microglobulin, Haemocyanin, Immunglobuline, Toxine (Cholera-, Tetanus-, Diptheria-Toxin u.a.), Polysaccharide, Lipopolysaccharide, natürliche oder synthetische Polyadenyl- und Polyuridylsäuren, Polyalanyl- und Polylysin-Polypeptide oder Zellmembrankomponenten, wie beispielsweise Formalin- oder Glutaraldehyd-behandelte Erythrozytenzellmembranen.

Ebenso geeignet für die Verwendung als Carrier-Molekül ist beispielsweise die gereinigte IgG-Fraktion gegen Maus IgG (H+L) aus Kaninchen gemäß dem bei H. Kawamura und J.A. Berzofsky (J. Immunol. 58 (1986), S. 136) beschriebenen Verfahren.

Die Kopplung von Haptenen an Carriern erfolgt nach an sich etablierten Techniken (P. Tijssen in: "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", Burdon, R.H. & Knippenberg, P.H., Hrsg., Elsevier, Oxford, UK 1985).

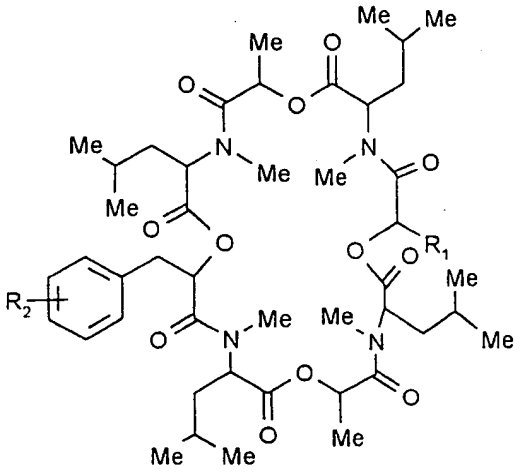
Die Konjugation des Haptens an das Trägermolekül kann entweder direkt oder aber vorzugsweise über ein Brückenglied erfolgen, welches gegebenenfalls zunächst an das Haptenmolekül angelagert wird.

Die Kupplung der offenkettigen und cyclischen Depsipeptide als Haptene, insbesondere des PF 1022A oder seiner Derivate, an das Trägermolekül muß dabei in der Weise erfolgen, daß die relevanten Strukturelemente der Depsipeptide frei zugänglich bleiben und somit in der Lage sind eine spezifische Immunantwort auszulösen, d.h. die Bildung spezifischer Antikörper zu induzieren.

Als bevorzugte Haptene dienen Depsipeptid-Liganden aus offenkettigen oder cyclischen Depsipeptiden mit 6 bis 30 Ringatomen, bestehend aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren als Bausteine.

Als ganz besonders bevorzugte Haptene dienen Depsipeptid-Liganden aus cyclischen Depsipeptiden mit 24 Ringatomen, bestehend aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren als Bausteine.

Zu den cyclischen Depsipeptiden mit 24 Ringatomen zählen Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



(I)

in welcher

R_1 für gegebenenfalls substituiertes Benzyl, wobei als Substituenten genannt seien Wasserstoff, C_{1-4}-Alkyl, insbesondere Methyl, Hydroxy, Halogen, insbesondere Fluor, C_{1-4}-Alkoxy, insbesondere Methoxy oder tert.-Butyloxy, Nitro, Amino, Dialkylamino, insbesondere Dimethylamino oder Diethylamino, N-Morpholinyl, N-Pyrrolidinyl oder N-Piperidinyl, steht,

R_2 für Wasserstoff, C_{1-4}-Alkyl, insbesondere Methyl, Hydroxy, Halogen, insbesondere Fluor, C_{1-4}-Alkoxy, insbesondere Methoxy oder tert.-Butyloxy, Nitro, Amino, Dialkylamino, insbesondere Dimethylamino oder Diethylamino, N-Morpholinyl, N-Pyrrolidinyl oder N-Piperidinyl, steht,

wobei

a) für den Fall, daß R_1 für Benzyl steht,

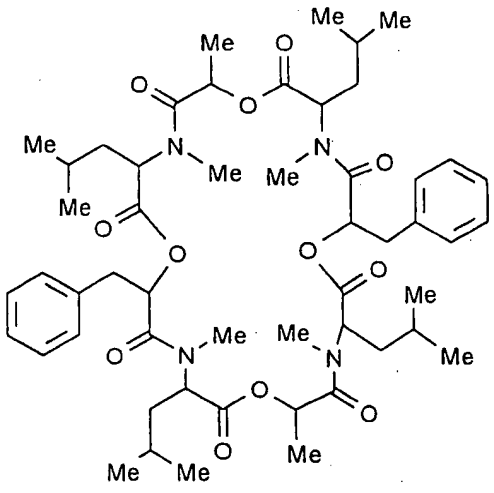
R_2 für Wasserstoff, Hydroxy, C_{1-4}-Alkoxy, insbesondere Methoxy, Halogen, insbesondere Fluor, Alkenyloxy, insbesondere Allyloxy, steht,

b) für dem Fall, daß R_1 für Methyl steht,

R_2 für Wasserstoff, Hydroxy, C_{1-6}-Alkoxy, insbesondere Methoxy, Nitro, Amino, Dialkylamino, insbesondere Dimethylamino, N-Morpholinyl steht.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können in ihren optisch aktiven, stereoisomeren Formen oder als racemische Gemische vorliegen. Vorzugsweise werden die optisch aktiven, stereoisomeren Formen der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) verwendet. Besonders bevorzugt werden die cyclischen Depsipeptide verwendet, die sich aus L-konfigurierten Aminosäuren und D-konfigurierten Hydroxycarbonsäuren als Ringbausteine zusammensetzen.

Beispielhaft sei als cyclisches Depsipeptid die aus EP-OS 382 173 und EP-OS 503 538 bekannte Verbindung PF 1022A der folgenden Formel (Ia), in der R_1 für Benzyl und R_2 für Wasserstoff steht, genannt:

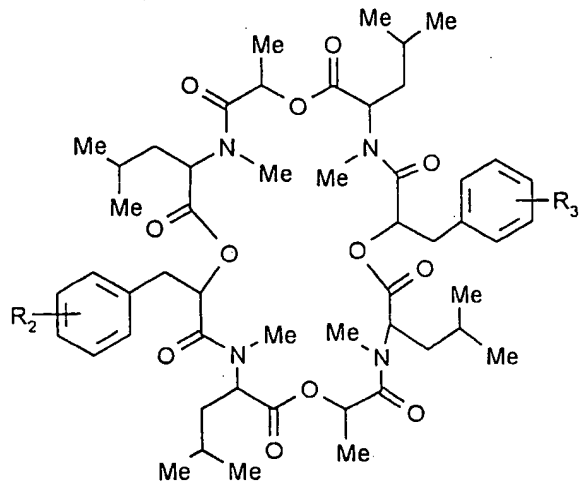


(Ia)

Außerdem seien als cyclische Depsipeptide die aus der PCT-Anmeldung WO 93/19053 und EP 0 634 408 A1 bekannten Verbindungen genannt, die geeignete funktionelle Gruppen enthalten, die eine direkte kovalente Kopplung an

ein Carrier-Protein oder aber eine Kopplung über ein Brückenmolekül an ein Carrier-Protein gestatten.

Insbesondere seien aus der PCT-Anmeldung WO 93/19053 und EP 0 634 408 A1 die Verbindungen der folgenden Formel (Ib), in der R_1 für (R_3) substituiertes Benzyl steht, genannt:



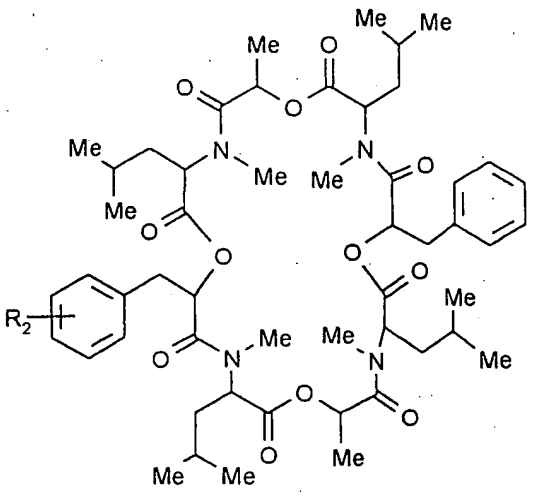
(Ib)

in welcher

R_2 und R_3 jeweils für Nitro, Amino oder Hydroxy stehen.

Weiterhin seien als Depsipeptide die aus der PCT-Anmeldung WO 94/19334 bekannten Verbindungen genannt.

Insbesondere seien aus der PCT-Anmeldung WO 94/19334 die Verbindungen der folgenden Formel (Ic), in der R_1 für Benzyl steht, genannt:



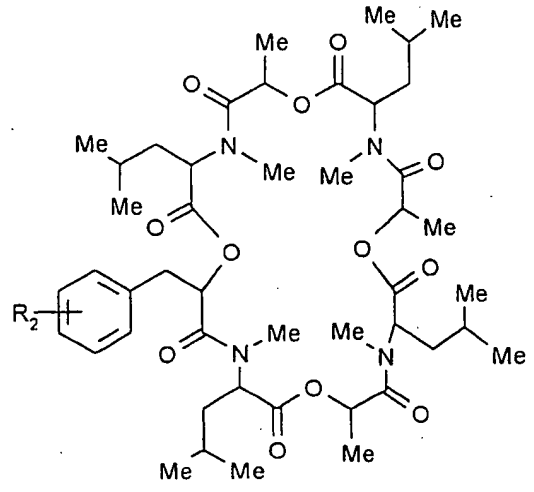
(Ic)

in welcher

R_2 für Hydroxy steht.

Schließlich seien als Depsipeptide die aus der PCT-Anmeldung WO 95/07272 bekannten Verbindungen genannt.

Insbesondere seien aus der PCT-Anmeldung WO 95/07272 die Verbindungen der folgenden Formel (Id), in der R^1 für Methyl steht, genannt:



(Id)

in welcher

R_2 für Nitro, Amino oder Methoxycarbonylamino steht.

Besonders bevorzugt werden cyclische Depsipeptide mit 24 Ringatomen der allgemeinen Formel (Ib) eingesetzt, die über eine freie primäre Aminogruppe des Benzylfragments, gegebenenfalls mittels eines geeigneten Brückengliedes, mit einer primären Aminofunktion auf dem Carrier-Protein zur kovalenten Hapten-Carrier-Bindung gebunden sind.

Als Brückenglieder für eine Konjugation des Haptens, insbesondere des Cyclodepsipeptids PF 1022A und seiner Derivate der allgemeinen Formel (Ib), an das Carrier-Molekül kommen in erster Linie Verbindungen in Betracht, die mindestens zwei oder aber mehrere reaktive Gruppen enthalten, welche in der Lage sind, mit den frei zugänglichen reaktiven Gruppen des Carrier-Moleküls in Wechselwirkung zu treten.

Besonders bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist die Verwendung von Brückengliedern die zwischen 3 und 10 Brücken-C-Atome umfassen und die als reaktive Gruppen z.B. Amino-, Formyl-, Carboxyl- oder SH-Gruppen besitzen.

Diese reaktiven Gruppen können mit Hilfe bekannter Verfahren mit den reaktiven Gruppen des Hapten- und Carrier-Moleküls zur Reaktion gebracht werden unter Ausbildung eines Hapten-Carrier-Konjugates.

So ist es beispielsweise möglich ein Brückenglied über eine reaktive Aminogruppe, insbesondere der Derivate des Cyclodepsipeptids PF 1022A, mit Hilfe von Dialdehyden, wie z.B. Glutardialdehyd, an eine der freien Aminogruppen des Carrier-Moleküls zu binden.

In einer spezifischen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung geht man von den in der PCT-Anmeldung WO 93/19053 und EP 0 634 408 A1 genannten Derivaten des Cyclodepsipeptids PF 1022A der allgemeinen Formel (Ib), vorzugsweise vom Nitrobenzyl-Derivat aus und setzt diese Verbindungen mit Hilfe bekannter Methoden, wie z.B. durch Hydrierung, in einem weiteren Reaktionsschritt sehr einfach in das bekannte Aminobenzyl-Derivat des Cyclodepsipeptids PF 1022A um.

Die eigentliche Kopplungsreaktion erfolgt dann vorzugsweise mit Hilfe der Diazokupplung. Dabei wird das Aminobenzyl-Derivat des Cyclodepsipeptid PF 1022A

zunächst in einem geeigneten Lösungsmittel solubilisiert. Als geeignete Lösungsmittel kommen insbesondere Wasser und verdünnte Säuren in Betracht.

Im Anschluß an die Umwandlung der Aminofunktion in das entsprechende Diazoniumsalz nach literaturbekannten Methoden (vgl. Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Band X/3) wird das Carrier-Protein wie z.B. BSA oder KLH zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 0,1 bis 12 Stunden, vorzugsweise 2 bis 4 Stunden wird neutralisiert, dialysiert und anschließend lyophilisiert. Der Rückstand kann dann gegebenenfalls nach Zwischenschaltung weiterer Reinigungsschritte und nachfolgender Bestimmung des Substitutionsgrades (vgl. P. Tijssen in: "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", Burdon, R.H. & Knippenberg, P.H., Hrsg., Elsevier, Oxford, UK 1985) für die eigentliche Immunisierungsreaktion verwendet werden.

Neben der als bevorzugt genannten Diazokupplung, können auch alternative Verfahren für die Kupplung des Haptens an das Carrier-Molekül verwendet werden, wie z.B. die Schiffbasenbildung, die Aktivestermethode oder die gemischte Anhydridmethode. Bei der zuletzt genannten Methode wird die Carboxylfunktion des Brückengliedes unter Verwendung von Essigsäureanhydrid oder des Carbodiimid-Derivates 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimid an das Carrier-Molekül geknüpft.

Besitzt das Brückenglied beispielsweise eine reaktive SH-Gruppe, so kann alternativ die Konjugation des Haptens an das Carrier-Molekül durch eine Oxidation mit freien SH-Gruppen des Carriers durchgeführt werden.

Die Immunisierung der Donortiere, bevorzugt Kaninchen (Code-Nr.: SA 1100 - 1102, SA 1003 - 1005, Fa. Eurogentec, Seraing, Belgien), erfolgt durch eine ein- bis mehrmalige Applikation der an das hochmolekulare Carrier-Protein, beispielsweise KLH oder BSA, gekoppelten Depsipeptid-Haptene.

Die bevorzugte Applikationsform ist die Injektion, die sowohl intravenös, intraperitoneal oder subcutan erfolgen kann.

Besonders bevorzugt ist jedoch eine intravenöse Injektion.

In einer spezifischen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die KLH-PF 1022A-Derivat- und BSA-PF 1022A-Derivat-Konjugate (Komplexe) zur Immunisierung von mehreren Donortieren, insbesondere von drei Kaninchen, pro Carrier-Hapten-Komplex eingesetzt. Die erste Boost-Immunisierung erfolgt dabei 14 Tage nach der Erstimmunisierung. Weitere Boost-Immunisierungen, insbesondere 10 Boost-Immunisierungen, folgen dann im Abstand von jeweils 4 Wochen. Ab der dritten Boost-Immunisierung wird jeweils nach 10 Tagen das erfindungsgemäße Serum gewonnen.

Der Erfolg der Immunisierung läßt sich durch Bestimmung der Konzentration von spezifischen Antikörpern mit einem, dem Fachmann an sich bekannten Enzym-gekoppelten Immunoassay (ELISA "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay") oder durch Western blot-Analyse kontrollieren. Polyklonale Antiseren, die bei der Western blot-Analyse gute Signale produzieren, sind für ein "Immunscreening" von cDNA-Bibliotheken verwendbar.

Besonders bevorzugt zur Bestimmung der Spezifität des Antiserums gegen Depsipeptide, insbesondere gegen PF 1022A-Derivat ist die Western blot-Analyse.

Dabei werden die Carrier-Hapten-Komplexe, insbesondere der KLH-PF 1022A-Derivat-Komplex und das Carrier-Protein KLH oder der BSA-PF 1022A-Derivat-Komplex und das Carrier-Protein BSA in einem SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgel) aufgetrennt (vgl. Laemmli et al., Nature 227, 1970, S. 680-685) und die erhaltenen Proteine anschließend auf Nitrozellulose geblottet. Alternativ werden die Carrier-Hapten-Komplexe bzw. die Carrier-Proteine auch mittels einer "Minifold S" Apparatur (Schleicher & Schuell, Dassel) direkt auf Nitrozellulose-Filter geblottet. Die Inkubation der Filter mit geeigneten Serumverdünnungen, bevorzugt im Verhältnis 1:1.000, ganz besonders bevorzugt im Verhältnis 1:500, führt zu einer deutlich stärkeren Nachweisreaktion mit den erfindungsgemäßen Carrier-Hapten-Komplexen als mit den Carrier-Proteinen KLH oder BSA (Verwendung von alkalischer NBT/BCIP-Lösung; vgl. Herstellungsbeispiele).

Die auf diese Weise erhaltenen spezifischen, polyklonalen Antikörper werden dann in immunologischen Verfahren, wie beispielsweise dem erfindungsgemäßen "Immunscreening", zur Isolierung und Charakterisierung von cDNA-Sequenzen eingesetzt, die für Proteine kodieren, die in verschiedenartigen Nematodenspezies vorkommen und für die Bindung von cyclischen oder offenkettigen Depsipeptiden

als Liganden, bestehend aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren als Bausteine, insbesondere des cyclischen Depsipeptids PF 1022A, verantwortlich sind.

Darüber hinaus ist selbstverständlich der Einsatz der erfindungsgemäßen Antikörper in allen bekannten Immunoassays, wie z.B. immunoradiometrischen Tests nach Markierung des Tracerantikörpers mit Chloramin T oder Bolton-Hunter-Reagenz, sowie anderen kompetetiven und nicht-kompetetiven Bindungsassays, wie Fluoreszenz-, Enzym- (ELISA), Chemilumineszenz- oder anderen Immunoassays, einschließlich allen Formen des Radioimmunoassays (RIA) denkbar. (Harlow, E.: Lane, d. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH; 2nd Edn.; New York; 319 bis 359; 353 bis 612). Dabei ist es unerheblich, ob der Schichtantikörper an Polystyrolröhrchen, Polystyrolkügelchen, paramagnetische Partikel oder aktivierte Säulenmaterialien aller Art kovalent oder nicht-kovalent gebunden ist.

Im Rahmen der Erfindung werden zur Konstruktion einer statistisch, repräsentativen cDNA-Bibliothek polyadenylierte RNA-Fraktionen, die aus parasitären Nematoden nach der von Chirgwin et al. beschriebenen Guanidinium-Isothiocyanat/Cäsiumchlorid-Kissen Methode (vgl. Biochemistry 18, 1979, S. 5294 bis 5299) isolierbar sind, für die cDNA-Synthese verwendet.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden bevorzugt zur Konstruktion einer statistisch repräsentativen cDNA-Bibliothek polyadenylierte RNA-Fraktionen aus parasitären Nematoden der Ordnung der Strongylida, insbesondere Haemonchus spp. oder Trichostrongylus spp., für die cDNA-Synthese verwendet.

Die Synthese erfolgt entsprechend den bekannten Methoden des "Great Length cDNA Synthesis Kit" von Clontech (Heidelberg).

Die Erststrangsynthese wird mit geeigneten Primern, insbesondere einem Oligo$(dT)_{25}$(dN) Primer, durchgeführt. EcoRI Adaptoren werden an die doppelsträngige cDNA ligiert und cDNA-Moleküle > 500 bp über Chromaspin-Säulen (Clontech) fraktioniert.

Nach Ligation der cDNA in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors λZAPII (Stratagene, Heidelberg) werden die Konstrukte in vitro verpackt (Gigapack Gold II, Stratagene).

In einer spezifischen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die weiter oben erhaltenen Antiseren gegen die Carrier-Hapten-Komplexe, insbesondere aber der KLH-PF 1022A-Derivat-Komplex, nun im "Immunscreening" eingesetzt.

Dazu werden nach Entfernung der Anti-E. coli Antikörper aus den genannten Antiseren durch Inkubation mit Filter-gebundenem E. coli Lysat, ca. 5.000 "plaque forming units" (pfu) der Bibliothek pro Assay auf LB-Agar plattiert und so lange bei +37°C inkubiert bis Plaques sichtbar werden. Anschließend erfolgt eine Expressionsinduktion der Fusionsproteine mittels Induktor gesättigtem Nitrozellulosefilter.

Vorzugweise verwendet man hierfür den Induktor Isopropyl-ß-thiogalakto-pyranosid (IPTG).

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 1 bis 24 Stunden, bevorzugt von 4 bis 12 Stunden bei Temperaturen zwischen +40°C und +45°C, bevorzugt bei +42°C, werden die Filter mit den Carrier-Hapten-Komplexen, insbesondere dem KLH-PF 1022A-Komplex, inkubiert.

Die Inkubationszeit mit den Carrier-Hapten-Komplexen, insbesondere dem KLH-PF 1022A-Komplex, beträgt 1 bis 12 Stunden. Die Inkubation erfolgt bei Temperaturen zwischen +5 und +45°C, bevorzugt jedoch bei Raumtemperatur. Danach werden die Filter für 4 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Antiserum inkubiert. Das Antiserum liegt in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:2.000, bevorzugt von 1:500 bis 1:1.000, vor.

Im Anschluß an die Detektion der gebundenen Antikörper, beispielsweise mit an alkalischer Phosphatase gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörpern und NBT/BCIP-Substratlösung, erfolgt die Abtrennung positiver Agarbereiche sowie eine Eluierung der Phagen.

Die auf diese Weise erhaltenen Phagen werden einem "rescreening" unterworfen. Die isolierten reinen Phagenklone können dann mittels in vivo Exzision zu Plasmidklonen konvertiert, und die Plasmid-DNA kann für weitere DNA-Analysen eingesetzt werden.

Beide Stränge der erfindungsgemäßen cDNA werden mehrmals über automatische Laser-Fluoreszenz-Sequenzierung analysiert und die Sequenzdaten mit einer Software der Genetics Computer Group Inc. (Madison, WI, USA) weiter untersucht.

Auf diese Weise wurden erfindungsgemäß zwei klonierte cDNA's mit der Bezeichnung pHC-1 bzw. pHC-2 erhalten.

Die in den Sequenzprotokollen ID No. 1 und 3 gezeigten erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten jeweils einen "offenen Leserahmen" für ein Protein, das den Wirkstoff PF 1022A und andere Wirkstoffe mit ähnlichen immunulogischen Bindungseigenschaften erkennt.

Der erste klonierte cDNA mit der Bezeichnung pHC-2 weist 972 Basen der im Sequenzprotokoll ID No. 1 gezeigten Sequenz auf.

Der nicht-kodierende 5'-Abschnitt der erfindungsgemäßen pHC-2 cDNA besteht nur aus 10 Basen. Die durch Northern blot-Analyse bestimmte Größe der komplementären RNA (1,05 kb) stimmt sehr gut mit der Länge der cDNA überein.

Für die pHC-2 cDNA Sequenz mit 972 Basen (vgl. Sequenzprotokoll ID No. 1) stellt die erste Nucleotidsequenz ATG an der Sequenzposition 11 das Startkodon dar. So ist beispielsweise diese Initiationsstelle der Translation vom Kozak-Typ (vgl. M. Kozak, J. Cell Biol. 108, 1989, S. 229). Darüber hinaus ist ein N-terminales Signalpeptid mit der Spaltstelle zwischen 18 und 19 detektierbar (vgl. von Heinje, Nucleic Acids Research 14, 1986, S. 4.683 bis 4.690).

Aus der Nucleotidsequenz der erfindungsgemäßen pHC-2 cDNA mit 972 Basen der im Sequenzprotokoll ID No. 1 gezeigten Sequenz des gastrointestinalen Nematoden *Haemonchus contortus* läßt sich die entsprechende Aminosäuresequenz für das Protein ableiten. Das erfindungsgemäße erste Protein, das PF 1022A erkennt, ist dadurch gekennzeichnet, daß es eine Sequenz von 207 Aminosäuren mit einem daraus resultierenden Molekulargewicht von 23.991 g/mol aufweist (s. Sequenzprotokoll ID No. 2).

Das erste erfindungsgemäße Protein ist ein integrales Membranprotein. Es besitzt neben der Signalpeptidsequenz eine potentielle Transmembranregion (Position 174-

190). Eine Glycosylierungsstelle ist am Asparagin (Asn) der Position 167 lokalisierbar. Bevorzugt finden Glycosylierungen des erfindungsgemäßen Proteins an dieser Position 167 statt.

Darüber hinaus lassen sich aus dem Aminosäuresequenz Sequenzprotokoll ID No.2 des erfindungsgemäßen Targetproteins drei potentielle antigene Determinanten, im Bereich der Abschnitte 69 bis 75, 157 bis 162 und 159 bis 164, ableiten.

Diese Determinanten der Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen Proteins sind bevorzugt zur Erzeugung monoklonaler Antikörper gegen das Protein von Bedeutung.

Das erste erfindungsgemäße Protein, welches das Depsipeptid PF 1022A erkennt, zeigt Ähnlichkeiten zu verschiedenen Proteinen aus unterschiedlichen Organismen (Swiss-Prot Datenbank mit 43.470 Proteinsequenzen). 'Best Fit' Analysen ergeben eine Identität von 28 % bzw. eine Ähnlichkeit von 53 % zum 25 kDa Glycoprotein GP25L von Canis familiaris (EMBL Accession Nr. P27869). GP25L ist ein Teil eines heterotetrameren Ca^{2+}-bindenden Proteinkomplexes des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Dieser Komplex ist offenbar für die Retention von ER-residenten Proteinen von Bedeutung (Wada et al., J. Biol. Chem. 266, 1991, S. 19.599 bis 19.610).

Der Xenopus laevis cDNA Klon X1262 (EMBL Accession Nr.: X90517) kodiert ebenfalls ein GP25L-ähnliches Protein (Joost et al., Biochem. J. 312, 1995, S. 205 bis 213), das eine Identität von 56 % bzw. Ähnlichkeit von 73 % zum erfindungsgemäßen Targetprotein aufweist.

Ein humanes EST ("expressed sequence tag" cDNA-Fragment; EMBL Accession Nr: T32283) kodiert gleichfalls ein GP25L-ähnliches Aminosäurefragment, das eine Identität von 71 % bzw. Ähnlichkeit von 83 % zum erfindungsgemäßen Protein aufweist.

Das Protein zeigt außerdem eine Identität von 24 % bzw. eine Ähnlichkeit von 52 % zu dem 23 kDa Saccharomyces cerevisiae-Vorläuferprotein P24B (EMBL Accession Nr: P32803). Dieses Protein ist wahrscheinlich am Transport von einigen sekretorischen Proteinen vom ER zum Golgi-Komplex beteiligt (Schimmöller et al. EMBO J. 14, 1995, S. 1.329 bis 1.339).

Gemeinsamkeiten des GP25L-Vorläuferproteins bzw. GP25L-ähnlichen Proteinen zum erfindungsgemäßen Protein sind die Signalsequenz für den Transport in das ER, die Transmembrandomäne, eine N-Glykosylierungsstelle sowie eine ähnliche Molmasse.

Durch Northern blot Analyse für die zum zweiten cDNA Klon pHC-1 korrespondierende mRNA wurde eine Größe von ca. 3,5 kb ermittelt. Der über das Immunscreening isolierte Klon pHC-1 weist eine Größe von 2 kb auf. Der noch fehlende 5'-Bereich der mRNA wurde mittels der 5'-RACE Methodik isoliert [M. A. Frohmann (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White eds.) S. 28-38, Academic Press, San Diego, USA]. Die so aus mehreren cDNA-Fragmenten charakterisierte mRNA setzt sich aus 3.539 Basen der im Sequenzprotokoll ID No. 3 gezeigten Sequenz zusammen.

Der 5'-nicht translatierte Abschnitt der mRNA (vgl. Sequenzprotokoll ID No. 3) umfaßt 98 Basen. Es kann sein, daß noch einige Basen des 5'-Endes der mRNA fehlen. Der 3'-nicht translatierte Abschnitt (ohne poly(A)-tail) besteht aus 462 Basen. Das wahrscheinliche Startkodon vom Kozak-Typ liegt an Sequenzposition 99, obwohl strangaufwärts noch zwei weitere ATG-Kodons liegen. Diese scheiden aber als Initiationsstelle der Translation aus folgenden Gründen aus: Das ATG an Sequenzposition 22 ist nicht vom Kozak-Typ und die von dieser Position deduzierte Aminosäuresequenz bricht bereits mit einem TAA-Stop an Position 55 ab. Das ATG an Sequenzposition 75 ist ebenfalls nicht vom Kozak-Typ und die von dieser Position deduzierte Aminosäuresequenz bricht mit einem TAA-Stop bereits an Position 90 ab. Ausgehend vom Startkodon ab Position 99 ist das zweite erfindungsgemäße Targetprotein, das PF 1022A erkennt, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Sequenz aus 986 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 109.740 g/mol aufweist (s. Sequenzprotokoll ID No. 4). Zudem zeigt das erfindungsgemäße Protein einen *pI* von 6.13.

Das zweite erfindungsgemäße Protein ist ebenfalls ein integrales Membranprotein. Es besitzt neben einem aminoterminalen Signalpeptid (Spaltstelle zwischen den Aminosäuren 18 und 19) fünf Transmembrandomänen (Aminosäureabschnitte: 531 bis 562, 595 bis 615, 673 bis 700, 725 bis 744 und 750 bis 774). Potentielle N-Glykosylierungsstellen sind jeweils am Asparagin (Asn) in Position 26, in Position 499 sowie in Position 862 lokalisierbar.

Darüber hinaus lassen sich aus der Aminosäuresequenz Sequenzprotokoll ID No. 4 des zweiten erfindungsgemäßen Targetproteins drei potentielle antigene Determinanten im Bereich der Aminosäureabschnitte 150 bis 156, 428 bis 434 und 799 bis 804 ableiten. Diese Determinanten der Aminosäuresequenz des zweiten erfindungsgemäßen Proteins sind bevorzugt zur Erzeugung monoklonaler Antikörper gegen das Protein von Bedeutung.

Besonders auffällig ist im aminoterminalen Bereich ein Abschnitt aus 20 Threonin (Thr)-Resten, der von einem Serin (Ser)-Rest unterbrochen ist (Aminosäureposition 128 bis 147), der carboxyterminale Teil des erfindungsgemäßen Proteins enthält auffällig viele Prolin (Pro)-Reste (Position 915 bis 926: extrem Prolinreicher Abschnitt). Das erfindungsgemäße Targetprotein weist allerdings keinen auffällig hohen Prolingehalt auf. Prolinreiche Abschnitte können 'Targets' für Protein-Protein Wechselwirkungen sein oder als 'Spacer' zwischen funktionalen Domänen fungieren (siehe z. B. Yu et al., Cell Vol. 78, 1994, S. 933-945; Linial, Neuroreport Vol. 5, 1994, S. 2009-2015).

Der cDNA-Abschnitt, der für das zweite erfindungsgemäße Protein kodiert, zeigte beim Screening der EMBL-Datenbank zwischen den Basen 1790 bis 2460, der im Sequenzprotokoll ID No. 4 gezeigten Sequenz, eine 60%ige Homologie zu einem Genomabschnitt des freilebenden Nematoden *C. elegans* (Accession-Nr: Z54306, Wilson et al., Nature Vol. 368, 1994, S. 32-38).
Der ähnliche *C. elegans* Genomabschnitt ist ein Exon eines Gens, dessen deduziertes Genprodukt ähnlich zu G-Protein gekoppelten Rezeptoren sein soll. Weitere Informationen über dieses Gen bzw. Genprodukt existieren nicht, da die veröffentlichte Sequenz Produkt des *C. elegans* Genomprojektes ist (vgl. Wilson et al., Nature Vol. 368, 1994, S. 32-38). Die 'Best Fit' Analyse zeigt eine 49 %ige Identität bzw. 65 %ige Ähnlichkeit dieses deduzierten Proteins zu dem *H. contortus* Genprodukt. Auch das *C. elegans* Protein besitzt in der aminoterminalen Region einen Threonin (Thr)-Abschnitt aus 15 Resten, der ebenfalls von einem Serin (Ser)-Rest unterbrochen wird.

Die 'Best Fit' Analyse des zweiten erfindungsgemäßen Proteins im Vergleich zu verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zeigt folgendes Ergebnis: Zum Vorläuferprotein des Calcitonin Rezeptors des Schweins (SwissProt-Accession-Nr: P25117) besteht eine Identität von 22 % bzw. Ähnlichkeit von 44 %; zum Gastrin/ Cholecystokinin Typ B Rezeptor der Ratte (Accession-Nr: P30553) besteht eine

Identität von 20 % bzw. eine Ähnlichkeit von 45 % und zum Neuromedin K Rezeptor der Ratte (Accession-Nr.: P16177) besteht 18 % Identität bzw. 46 % Ähnlichkeit.

Weitere Proteine, die Threonin (Thr)-reiche Abschnitte aufweisen (aus der SwissProt-Datenbank), z. B. Integument Mucin aus *Xenopus laevis* (Accession-Nr: P10667, Q05049), Fasciclin II aus *Drosophila melanogaster* (P34083), intestinale alkalische Phosphatase aus der Maus (P24822) oder das Speichelprotein SGS-3 aus *Drosophila melanogaster* (P13729) zeigen - abgesehen vom gemeinsamen Threonin (Thr)-Abschnitt - keine weiteren signifikanten Ähnlichkeiten zum erfindungsgemäßen Protein.

Die beiden erfindungsgemäßen Proteine (vgl. Sequenzprotokolle ID No. 2 und 4) können als neue Prototypen von spezifischen Proteinen parasitärer Nematoden, insbesondere in Nematoden aus der Ordnung der Strongylida, wie beispielsweise *Haemonchus spp.*, angesehen werden.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen cDNA-Sequenzen (vgl. Sequenzprotokolle ID No. 1 und 3) ist es beispielsweise möglich, Zellinien herzustellen, die die jeweiligen erfindungsgemäßen Proteine permanent exprimieren. Hierzu werden mit an sich bekannten gentechnologischen Methoden die für diese Proteine kodierenden cDNA-Sequenzen jeweils in einen gegeigneten Vektor eingebaut, mit dem eine geeignete Zellinie, die das jeweilige Protein bisher nicht exprimierte, transformiert wird. Dadurch können Zellinien erhalten werden, die das jeweilig erste oder zweite erfindungsgemäße Protein (vgl. Sequenzprotokolle ID No. 2 und 4) konstant exprimieren.

So können die erfindungsgemäßen Proteine durch Expression in einem prokaryotischen oder eukaryotischen Expressionssystem in an sich bekannter Weise gewonnen werden.

Geeignete prokaryotische Expressionssysteme sind dabei alle bekannten Wirts-Vektor-Systeme wie Bakterien der Arten Streptomyces, spp. Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium oder Serratia marcescens, insbesondere E. coli, in denen die Expression einer unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehenden rekombinanten DNA möglich ist.

Als Promotoren für eine Expression in E. coli kommen natürliche, Hybrid- oder Bakteriophagenpromotoren in Betracht. Bevorzugt verwendet man hierbei Promotoren oder Operatoren aus der Gruppe lac-, lacuv5-, trp-, tac-, trc-, rac-, phoA-, P_L oder P_R des Phagen λ, hsp, omp oder synthetische Promotoren, wie sie beispielsweise in der DE-OS 3 430 683 bzw. in der EP-A 0 173 149 vorgeschlagen sind. Vorteilhaft ist z.B. die tac-Promotor-Operator-Sequenz, die inzwischen handelsüblich ist (z.B. Expressionsvektor pKK223-3, Pharmacia, "Molecular Biologicals, Chemicals and Equipment for Molecular Biology", 1984, S. 63).

Als geeignetes eukaryotisches Expressionssystem ist insbesondere das Baculovirussystem zu nennen.

Vorzugsweise verwendet man zur Expression der erfindungsgemäßen Proteine ein geeignetes eukaryotisches Expressionssystem, insbesondere das Baculovirussystem, bei dem post-translationale Modifikationen durchgeführt werden.

Bei der Expression der erfindungsgemäßen Proteine kann es sich als zweckmäßig erweisen, einzelne Kodons zu verändern. Dabei ist der gezielte Austausch von Basen in der kodierenden Region auch sinnvoll, wenn die genutzten Kodons in den Proteinen abweichend sind von der Kodonnutzung im heterologen Expressionssystem, um eine optimale Synthese des Proteins zu gewährleisten. Zudem sind oft Deletionen von nicht-translatierten 5'- bzw. 3'-Abschnitten sinnvoll, beispielsweise wenn mehrere destabilisierende Sequenzmotive ATTTA im 3'-Bereich der cDNA vorliegen. Dann sollten diese bei der bevorzugten Expression in Eukaryonten deletiert werden.

Veränderungen dieser Art sind Deletionen, Additionen oder Austausch von Basen und ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Mit den erfindungsgemäßen spezifischen Antikörpern gegen die Proteine können beispielsweise durch Western blot-Analysen homologe bzw. kreuzreagierende Proteine anderer, parasitärer Nematoden, detektiert werden.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Proteine und ihrer Homologen können neue spezifische Wirkstoffe gegen Nematoden gefunden werden.

Insbesondere kann das erfindungsgemäße Protein aufgrund der potentiellen Rezeptoreigenschaften zur Bindung von offenkettigen oder cyclischen Depsipeptiden als Liganden, bestehend aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren als Bausteine, in geeigneten Testkits zum Screening auf nematizide Wirkung dieser Verbindungen verwendet werden.

Die Wirkstoffe, die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Proteine gefunden werden, eignen sich bei günstiger Warmblütertoxizität zur Bekämpfung von pathogenen Endoparasiten, die bei Menschen und in der Tierhaltung und Tierzucht bei Nutz-, Zucht-, Zoo-, Labor-, Versuchs- und Hobbytieren vorkommen. Sie sind dabei gegen alle oder einzelne Entwicklungsstadien der Schädlinge sowie gegen resistente und normal sensible Arten wirksam. Durch die Bekämpfung der pathogenen Endoparasiten sollen Krankheit, Todesfälle und Leistungsminderungen (z.B. bei der Produktion von Fleisch, Milch, Wolle, Häuten, Eiern usw.) vermindert werden, so daß durch den Einsatz der Wirkstoffe eine wirtschaftlichere und einfachere Tierhaltung möglich ist. Zu den pathogenen Endoparasiten zählen Nematoden. Ganz besonders genannt seien:

Aus der Ordnung der Enoplida z.B.: Trichuris spp., Capillaria spp., Trichomosoides spp., Trichinella spp..

Aus der Ordnung der Rhabditia z.B.: Micronema spp., Strongyloides spp..

Aus der Ordnung der Strongylida z.B.: Strongylus spp., Triodontophorus spp., Oesophagodontus spp., Trichonema spp., Gyalocephalus spp., Cylindropharynx spp., Poteriostomum spp., Cyclococercus spp., Cylicostephanus spp., Oesophagostomum spp., Chabertia spp., Stephanurus spp., Ancylostoma spp., Uncinaria spp., Bunostomum spp., Globocephalus spp., Syngamus spp., Cyathostoma spp., Metastrongylus spp., Dictyocaulus spp., Muellerius spp., Protostrongylus spp., Neostrongylus spp., Cystocaulus spp., Pneumostrongylus spp., Spicocaulus spp., Elaphostrongylus spp., Parelaphostrongylus spp., Crenosoma spp., Paracrenosoma spp., Angiostrongylus spp., Aelurostrongylus spp., Filaroides spp., Parafilaroides spp., Trichostrongylus spp., Haemonchus spp., Ostertagia spp., Marshallagia spp., Cooperia spp., Nematodirus spp., Hyostrongylus spp., Obeliscoides spp., Amidostomum spp., Ollulanus spp..

Aus der Ordnung der Oxyurida z.B.: Oxyuris spp., Enterobius spp., Passalurus spp., Syphacia spp., Aspiculuris spp., Heterakis spp..

Aus der Ordnung der Ascaridia z.B.: Ascaris spp., Toxascaris spp., Toxocara spp., Parascaris spp., Anisakis spp., Ascaridia spp..

Aus der Ordnung der Spirurida z.B.: Gnathostoma spp., Physaloptera spp., Thelazia spp., Gongylonema spp., Habronema spp., Parabronema spp., Draschia spp., Dracunculus spp..

Aus der Ordnung der Filariida z.B.: Stephanofilaria spp., Parafilaria spp., Setaria spp., Loa spp., Dirofilaria spp., Litomosoides spp., Brugia spp., Wuchereria spp., Onchocerca spp..

Aus der Ordnung der Gigantorhynchida z.B.: Filicollis spp., Moniliformis spp., Macracanthorhynchus spp., Prosthenorchis spp..

Zu den Nutz- und Zuchttieren gehören Säugetiere wie z.B. Rinder, Pferde, Schafe, Schweine, Ziegen, Kamele, Wasserbüffel, Esel, Kaninchen, Damwild, Rentiere, Pelztiere wie z.B. Nerze, Chinchilla, Waschbär, Vögel wie z.B. Hühner, Gänse, Puten, Enten, Süß- und Salzwasserfische wie z.B. Forellen, Karpfen und Aale.

Zu Labor- und Versuchstieren gehören Mäuse, Ratten, Meerschweinchen, Goldhamster, Hunde und Katzen.

Zu den Hobbytieren gehören Hunde und Katzen.

Die Anwendung kann sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch erfolgen.

Die Anwendung der Wirkstoffe erfolgt direkt oder in Form von geeigneten Zubereitungen enteral, parenteral, dermal oder nasal.

Weiterhin können mit Hilfe der erfindungsgemäßen Proteine auch Antikörper, insbesondere monoklonale Antikörper, hergestellt werden, die nematizide Wirkung besitzen und als nematizide Wirkstoffe eingesetzt werden können.

Insbesondere können die drei antigenen Determinanten des ersten erfindungsgemäßen Proteins (ID-No. 2), die Abschnitte 69 bis 75, 157 bis 162 und 159 bis 164 für die Erzeugung monoklonaler Antikörper dienen.

Weiterhin können insbesondere die drei antigenen Determinanten des erfindungsgemäßen Proteins (ID-No. 4), die Abschnitte 150 bis 156, 428 bis 434 und 799 bis 804 für die Erzeugung monoklonaler Antikörper dienen.

Beispiel 1

Herstellung der KLH-PF 1022A- und BSA-PF 1022A-Derivat-Konjugate

200 mg Cyclo-(MeLeu-D-4-NH_2-PhLac-MeLeu-D-Lac-MeLeu-D-4-NH_2-PhLac-MeLeu-D-Lac-) werden in 4,39 ml eiskalter 0,1 N Salzsäure gelöst und bei 0°C mit 3,27 ml einer 0,05 M Natriumnitritlösung versetzt. Ebenfalls bei 0°C wird eine Lösung aus 200 mg BSA oder KLH mit 91,5 mg NaCl in 10 ml 0,5 M Natronlauge zugetropft. Man rührt noch zwei Stunden bei 0°C nach und neutralisiert mit konzentrierter Salzsäure. Anschließend wird dialysiert und lyophilisiert. Danach wird der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit Methylenchlorid gewaschen. Nach Abtrennung der wässrigen Phase wird erneut lyophilisiert. Die zumeist pulverigen KLH-PF 1022A-Derivat- und BSA-PF 1022A-Derivat-Konjugate lassen sich ohne weitere Reinigung für die nachfolgenden Immunisierungsversuche verwenden.

Beispiel 2

Herstellung von Antiserum gegen PF 1022A

Die KLH-PF 1022A-Derivat- und BSA-PF 1022A-Derivat-Konjugate (Komplexe) wurden zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt (3 Tiere pro Carrier-Hapten-Komplex). Die ersten Boost-Immunisierungen erfolgte 14 Tage nach der Erstimmunisierung. Im Abstand von jeweils 4 Wochen wurden insgesamt 10 weitere Boost-Immunisierungen durchgeführt. Ab der dritten Boost-Immunisierung wurde jeweils nach 10 Tagen ca. 20 ml Blut für die Serumgewinnung entnommen. 24 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere komplett ausgeblutet.

Die Spezifität des Antiserums gegen das PF 1022A-Derivat wurde durch Western blot-Analyse überprüft. Der KLH-PF 1022A-Derivat-Komplex sowie das Carrier-Protein KLH wurden über eine "slot blot" Apparatur (Minifold S, Schleicher & Schuell, Dassel) in gleichen Mengen (20 µg pro "slot") an Nitrozellulosefilter gebunden. Die Filter wurden mit einer 1:500 Verdünnung des Antiserums für vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit alkalischer Phosphatase-konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörpern (Sigma, Deisenhofen) und einer alkalischen Nitroblautetrazolium/5-Bromo-3-

chloro-3-indolylphosphat-Substratlösung (NBT/BCIP). Der KLH-PF 1022A-Komplex reagierte deutlich stärker mit dem Antiserum als KLH.

Beispiel 3

Identifizierung und Charakterisierung der cDNA

a) Konstruktion der cDNA-Bibliothek

Die Extraktion der totalen RNA des gastrointestinalen Nematoden Haemonchus contortus erfolgte nach der von Chirgwin et al. beschriebenen Guanidinium-Isothiocyanat/Cäsiumchlorid-Kissen Methode (Biochemistry 18, 1979, S. 5.294 bis 5.299). Die polyadenylierte RNA-Fraktion wurde anschließend über Oligo(dT)-Chromatographie gereinigt (Aviv & Leder, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 1972, S. 1.408 bis 1.412).

Zur Konstruktion einer statistisch repräsentativen cDNA-Bibliothek wurden 5 µg der polyadenylierten RNA-Fraktion für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die Synthese folgte den Vorschriften des "Great Lenght cDNA Synthesis Kit" von Clontech (Heidelberg). Die Erststrangsynthese wurde mit einem Oligo$(dT)_{25}$ (dN) Primer durchgeführt. EcoRI Adaptoren wurden an die doppelsträngige cDNA ligiert und cDNA-Moleküle > 500 bp über Chromaspin-Säulen (Clontech) fraktioniert. Nach Ligation der cDNA in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors λZAPII (Stratagene, Heidelberg) wurden die Konstrukte in vitro verpackt (Gigapack Gold II, Stratagene).

b) Immunscreening der cDNA-Bibliothek

Das Antiserum gegen den KLH-PF 1022A-Derivat-Komplex wurde für das Immunscreening verwendet. Um die Anti-E. coli Antikörper aus dem Antiserum zu entfernen, wurde 1:100 verdünntes Antiserum für vier Stunden bei Raumtemperatur mit Filter-gebundenem E. coli Lysat inkubiert. Ca. 5.000 "plaque forming units" (pfu) der Bibliothek wurden pro Assay auf LB-Agar plattiert und so lange bei 37°C inkubiert, bis Plaques sichtbar wurden. Es wurde dann ein mit Isopropyl-ß-thiogalakto-pyranosid gesättigter Nitrocellulosefilter auf die Platte gelegt, um die Expression der Fusions-

proteine zu induzieren. Nach einer Inkubationszeit von vier bis 12 Stunden bei 42°C wurde der Filter wieder entfernt und mit dem KLH-PF 1022A-Konjugat (20 mg/ml) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Filter mit Antiserum (1:500 bis 1:1.000 Verdünnung) für vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörpern und NBT/BCIP-Substratlösung detektiert.

Positive Agarbereiche wurden ausgestochen (20 bis 30 verschiedene Plaques) und die eluierten Phagen wurden einem "rescreening" unterworfen. Die letztlich isolierten reinen Phagenklone wurden mittels in vitro Excision zu Plasmidklonen konvertiert und die Plasmid-DNA für weitere Analysen eingesetzt.

c) DNA-Analyse

Die Analyse des Klons erfolgte über automatisierte Laser-Fluoreszenz-Sequenzierung (A.L.F.-DNA Sequencer, Pharmacia Freiburg, bzw. Licor 4000, MWG, Ebersberg) unter Verwendung des "Auto Read Sequencing" System (Pharmacia) bzw. des "Thermo-Sequenase Fluorescence" Sequenzierungskit (Amersham, Braunschweig). Beide Stränge der erfindungsgemäßen cDNA wurden mehrmals sequenziert. Sequenzdaten wurden mit der GCG Software (Genetics Computer Group Inc., Madison, WI, USA) analysiert. Es erfolgte die Benutzung der Protein- bzw. DNA-Bibliotheken der EMBL (Heidelberg).

d) Glyoxal-denaturierte poly-A^+-RNA (10 µg/Spur) wurde in Agarosegelen aufgetrennt und auf eine Hybond-N-Membran (Amersham, Braunschweig) transferiert (Chomczynski, Anal. Biochem. 201, 1992, S. 134 bis 139). Die Hybridisierung des Filters erfolgte über Nacht bei 65°C in 6 x SSC, 5 x Denhardt's Reagenz mit radioaktiv markierter Plasmid-DNA ("random priming" mit 50 µCi [α-^{32}P]dCTP). Die Membranen wurden anschließend unter hoher Stringenz in 0,2 x SSC, 0,5 % SDS bei 65°C gewaschen (Sambrock et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY, 1989).

Mit Hilfe der in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Techniken konnten zwei mRNA-Spezies aus Nematoden kloniert und vollständig sequenziert werden (vgl. Sequenzprotokolle ID No. 1 und 3, Anhang).

Die erste klonierte cDNA mit der Bezeichnung pHC-2 umfaßt 972 Basen und kodiert für ein Protein mit 207 Aminosäuren (vgl. Sequenzprotokoll ID No. 2).

Die aus mehreren cDNA-Fragmenten (pHC-1) charakterisierte zweite mRNA setzt sich aus 3.539 Basen zusammen und kodiert für ein Protein mit 986 Aminosäuren (vgl. Sequenzprotokoll ID No. 4).

Im folgenden Sequenzprotokoll zeigt:

Seq. ID No. 1 die Nucleotidsequenz der erfindungsgemäßen cDNA (pHC-2) aus dem gastrointestinalen Nematoden *Haemonchus contortus*. Die dargestellte cDNA umfaßt 972 Basen, die für 207 Aminosäuren des Proteins gemäß Seq. ID No. 2 kodieren. Start für die Kodierung von Protein ID No. 2 ist die Position 11.

Seq. ID No. 2 die aus der Nucleotidsequenz Seq. ID No. 1 abgeleitete Aminosäuresequenz des ersten Proteins aus dem gastrointestinalen Nematoden *Haemonchus contortus*. In dieser Sequenz liegen auf den Positionen

a) 1-18 NH_2-terminales Signalpeptid, Spaltstelle zwischen Aminosäuren 18 und 19,
b) 174-190 eine Transmembranregion,
c) 69-75 eine antigene Determinante,
d) 157-162 eine antigene Determinante,
e) 159-164 eine antigene Determinante,
f) 167 eine Stelle für N-Glycosylierungen.

Seq. ID No. 3 die Nucleotidsequenz der erfindungsgemäßen cDNA (pHC-1) aus dem gastrointestinalen Nematoden *Haemonchus contortus*. Die aus mehreren cDNAs charakterisierte mRNA besteht aus 3.539 Basen, die für 986 Aminosäuren des Proteins gemäß Seq. ID No. 4 kodieren. Start für die Kodierung von Protein ID No. 4 ist die Position 99.

Seq. ID No. 4 die aus der Nucleotidsequenz Seq. ID No. 3 abgeleitete Aminosäuresequenz des zweiten Proteins aus dem gastrointestinalen Nematoden *Haemonchus contortus*. In dieser Sequenz liegen auf den Positionen

a) 1-18 NH_2-terminales Signalpeptid, Spaltstelle zwischen Aminosäuren 18 und 19,
b) 531-562 erste Transmembrandomäne,
c) 595-615 zweite Transmembrandomäne,
d) 673-700 dritte Transmembrandomäne,
e) 725-744 vierte Transmembrandomäne,
f) 750-774 fünfte Transmembrandomäne,
g) 26 eine Stelle für N-Glycosylierungen,
h) 499 eine Stelle für N-Glycosylierungen,
i) 862 eine Stelle für N-Glycosylierungen,
j) 150-156 eine antigene Determinante,
k) 428-434 eine antigene Determinante,
l) 799-804 eine antigene Determinante.

Abbildung 1 zeigt die Nucleotidsequenz aus Seq ID 1 und zugeordnet die Aminosäuren des Proteins aus Seq ID 2.

Abbildung 2 zeigt die Nucleotidsequenz aus Seq ID 3 und zugeordnet die Aminosäuren des Proteins aus Seq ID 4.

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:
(A) NAME: BAYER AG
(B) STREET: BAYERWERK
(C) CITY: LEVERKUSEN
(E) COUNTRY: GERMANY
(F) POSTAL CODE (ZIP): D- 51368
(G) TELEPHONE: 0214/ 30 61285
(H) TELEFAX: 0214/ 30 3482

(ii) TITLE OF INVENTION: Proteine, dafuer kodierende DNA- Sequenzen, dagegen spezifische Antikoerper und ihre Verwendung zum Auffinden nematizider Wirkstoffe

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 4

(iv) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 972 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Haemonchus contortus

(vii) IMMEDIATE SOURCE:
(B) CLONE: pHC-2 cDNA- Klon

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

GTTTTTCACA ATGAGGTTCA TCACCTCATT GACGCTCCTG GCTTTGGTGA CGATCACCTG 60

CGGTATTCGT TTCCACGTAC CCGCGAATAA TAAGAAATGT ATGAAAGAAG AAATTCATAA 120

AAATATCGTT GTCACCGGTG AATACGAGTT CAGCGAAGGA ATCGGCTATA CAGGCAGTGT 180

CCATGTGACA GACACACGAG GACATACGCT GTACAAACGG GAGAAGTTCA GCGATTTGAA 240

GGGGAAGTTC GCTTTCACAG CTGATGAGTA CGACATTTTC GAAATCTGCA TCAGTAATCA 300

TGCTCCTATT ACGACAGGTC ATGTACAACC CCGAGAAGTA TCGTTGAAGA TGAAACATGG 360

AGTCGAAGCG AAGAACTACG AAGATCTCGC CAAAGCAGAG CAGCTGAAGC CGCTTGAGGT 420

CGAATTGCGA CGTCTAGAAG ATCTGTCTGA TCAGATTGTG AAGGATTTCG CCTTCATGCG 480

ACAGCGAGAA GAGGAAATGA GAAACACAAA CGAGTCCACA AACAGCCGTG TATTATACCT 540

ATCAATTTTC TCTATGCTTT GTCTTCTGGC CTTGGCTATA TGGCAGGTGA TGTTCTTGCG 600

CAATTATTTC AAGGCAAAGA AGCTCATTGA CTGAGCAGCT AGTCGGATTA GGTAGAAACG 660

CGTGATTTTT TCCTTGATTT ATGAAGTTAA TTTTTCTGGG TGACTGCCAT TCTTGTCTCA 720

AAGTTCCCGA AAATCGACTA GACTGTGGTT ATCTATGGCA CTACGTGTGA TACGCTAACC 780

TTTTCTCTTT TTTAATGCGA GTCACCTGAA TTTTGGCTAA ATCTAGATGT GATGTTGCTG 840

ACTAATCTTG TTTGTACTCC GTAATGATGA TGTGGGTAAC ATGGTTTAAG CTACCTTGTA 900

CTTATTATTT ATTGTTGATG AATTCGTTAT AATAAATTTG TTTCTTCCAA AAAAAAAAAA 960

AAAAAAAAAA AA 972

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 207 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS:
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Haemonchus contortus
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: PHC 2-Protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Phe Ile Thr Ser Leu Thr Leu Leu Ala Leu Val Thr Ile Thr
1 5 10 15

Cys Gly Ile Arg Phe His Val Pro Ala Asn Asn Lys Lys Cys Met Lys
20 25 30

Glu Glu Ile His Lys Asn Ile Val Val Thr Gly Glu Tyr Glu Phe Ser
35 40 45

Glu Gly Ile Gly Tyr Thr Gly Ser Val His Val Thr Asp Thr Arg Gly
50 55 60

His Thr Leu Tyr Lys Arg Glu Lys Phe Ser Asp Leu Lys Gly Lys Phe
65 70 75 80

Ala Phe Thr Ala Asp Glu Tyr Asp Ile Phe Glu Ile Cys Ile Ser Asn
85 90 95

His Ala Pro Ile Thr Thr Gly His Val Gln Pro Arg Glu Val Ser Leu
100 105 110

Lys Met Lys His Gly Val Glu Ala Lys Asn Tyr Glu Asp Leu Ala Lys
115 120 125

Ala Glu Gln Leu Lys Pro Leu Glu Val Glu Leu Arg Arg Leu Glu Asp
130 135 140

Leu Ser Asp Gln Ile Val Lys Asp Phe Ala Phe Met Arg Gln Arg Glu
145 150 155 160

Glu Glu Met Arg Asn Thr Asn Glu Ser Thr Asn Ser Arg Val Leu Tyr
165 170 175

Leu Ser Ile Phe Ser Met Leu Cys Leu Leu Ala Leu Ala Ile Trp Gln
180 185 190

Val Met Phe Leu Arg Asn Tyr Phe Lys Ala Lys Lys Leu Ile Asp
195 200 205

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 3539 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Haemonchus contortus

(vii) IMMEDIATE SOURCE:
(B) CLONE: PHC-1(full)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

TTCTGGCCGT CATCGCCGTT GATGCTGTCG CTTTCAGAAC GTCTCTTCTA TTACTAATTC 60

GAAAATTGAC GTGAATGAGC AGTTCGGTTT AATACCAACA TGAGGAATGT ATATATTCTT 120

CTGCTATCCG TCGTTGGGAC GTTTACCGTC GCAGAAGAAT TGCCAGCTCA ATCAAACAGT 180

TCCATTGTAG TATGCGAAGG TGGTACAGCC GAATTGGAAT GTCCCCATGG TATGGTCATT 240

TCAATAGCTC TGGCAAATTA TGGCCGATAT TCGGCTCGGG TTTGCTACGA GAACGAGGAA 300

CTGGACGATG TGGTACCGAT GACTCAATGC CATAACCCTA AAACGATGCC GACCCTTAGG 360

AAAAGTTGTG ATGGACGTCG TGAATGTCAT TTTGTGGTTG GTAACGACTT CTTCGTACAT 420

GATCCATGCC CAGGAGTGAA GAAATACCTT GAAGTCACAT ATCTGTGTGT TGCTGATGTG 480

ACTACCACAA CAACCACTAC GACGACGACC ACCACCACTA CCACTACATC CACCACAACA 540

GAGGTGGAGG ATGATGTTAA AGAAGATATG AGCGCGAAAT CTGCACCATC GACGTGTGCA 600

GCGACTTCGA GAAGAGGAAT CGAATGGCCT GCGACCATTT CTGGGACGAC GGTGAACCGG 660

CCATGTCCCG AAGGCACGAG AGGCACGTCC TCATGGAAAT GTTCCGCCGA GGGGCTGTGG 720

TCTGAACCTG GTCCAAATAC AATAGAGTGT CGCAGTGATT GGACCATTCA GCGGCAGGAT 780

GCTCTTGAAG AGACGATAAA AGATCAGGAT GCAAGCGGAA TTCCGGAGCT TCTTCGAGCG 840

ATGACGTCTG ATACCCGAAG ACCTATGGTA GCTGGTGATT TGCCAAAACT TCTAAACATT 900

CTTGACATCG TTCAAGATGT TGTTGGCAGA GAAGTGTGGG CAAAAAGTAG CCAGAAGTTG 960

GTGAACCAGC TTATTGTGAA TGTCGTACAT AATGCCCTTC GAGCGAAGGA AATGTGGCAG 1020

AACTGGCCGT CAGTGAAGCG TCAAACTTTC GCCACAAGAC TTTTGAATGG TGTTGAACGA 1080

GCCATGACCT CCTCCTCAAC AACTGTCTAT TCGTCTGAGA ACTATGTGCA ACCGTTGGTG 1140

ATGACAGAGA TGAGCGAAAG CATTCGGACT TCTTCGCAAC CATCGAACTA CTTCCTATTC 1200

CCTTCAATGG CCTTGTGGGC TGGTGAAAAT AACGTGGATA GCGTTGACGT TCCAAGGGAA 1260

GCTCTCGAAA TGACAGGATT GGACCGTGCC CGAGTCTACT ATGCGTCTTT TGCGAACATT 1320

GGTGAGGAAA TGGAACCTCC GGTGGAGATA TCAGCAGGAT CTGAACAGAA GCCGACTGGA 1380

CTAGAAAGAC GTCGCCGAAT TGTTTCACGT GTGGTGGCCG TGTCGCTTGT TCTCGATGGC 1440

AAAGTCATAA GGCTACCAAT ACTTCCTAAG CCGATCATCA TCACATTCCA TCATTACCCT 1500

GAGGCTTTAC GGCGGATGTC CTCACCTGAA TGTTCTTGGT GGGATACTGA AGACATGAAG 1560

TGGTCTACAA GTGGATGCTC CCTACAATCG CATAATTCTA CTCATACCGT ATGCGCTTGT 1620

AGTCATATGA CTCACTTTGC CGTTTTGATG GATTATGTCG GTCATGAGAT TTCCTCCGAG 1680

GATAATCAGC TTCTTACATT TCTCACATAT ACCGGTTGCA CGCTGTCAAT AGTCTGCCTT 1740

ACTCTGACAT TCTTCTGTTT TGTTGTCTTC ATCAAAGGAG GAGGCGATAG GGTTTTCATT 1800

CATAAAAATC TCTGCGCTTC TCTTGGTATA GCCGAACTGG TGTTCCTCGC TGGAATTTGG 1860

AGGACAGAAG AAAAGTTTGA ATGCGGTATG ATCGCTGGTT GCCTCCTTTA TTTCTTTCTA 1920

TCGGCTTTAA CCTGGATGTT ACTCGAGGGC TACCAGCTTT ACCAGATGCT TGTTGAGGTG 1980

TTCCCTGCCT CGCGACGTCG ATTCACCTTT TTCCTTGTTG GCTATGGCCT GCCAGCTATC 2040

ATTACTGGAG CAGCCGCTTA TTACGACCCG ACTGGTTTTG GAACACGCAA TCATTGCTGG 2100

TTACGCACCG ACAACCTTTT CATTTTATTC TTTGTCGCAC CAGCAGCTGT GATTTTACTG 2160

ACGAATACGA TGTTCCTGTT CATGACTATG TGCATTGTAT ACAGACATTC GAAGTATATC 2220

CCCTGTAGGC ATGCTGCGGA TAATGGAGGT GACATAAGGA CTTGGGTCAA AGGAGCGATG 2280

GGTCTGGTCT GTCTACTTGG TGTCACATGG ACTTGTGGCC TTCTCTGGAT CGATGATGGC 2340

CATTCGATAG TGATGGCATA CGCGTTTACC ATTGCGAATT CCCTTCAGGG TCTTTTCATC 2400

TTTGTCTTCC ATGTGCTCTG CTCAGAGAAG ATGCGTTACG ATATTGCCCG ATGGTGTGGC 2460

AAGCATGGCC TTTCATGTAT CAGCTCTGGC TCCCGTGATA CCTCTAGGGA TCTACAAAAA 2520

CGTGGAACTA TGTCACCGTC GGAGAGGAGT GGCAGCGAAT TCATCTATCC CACATCGGAG 2580

AAGATGCACA CATCTCCTCG TGGATTGGAA TCCTCTCTCA GCTCGGCCTA TCCTCAACAA 2640

CCACTCATCC ACCACTATCA GCGTCGTCCA CCGCAACAGC CTAATGGAAC TTATGACTAC 2700

GCAACAATTG CGTATGGCGA GATGGTACCA GGCCATATGT TACCACGCAT GGCCTCCTCG 2760

TTTCCTCATC CAGGTGTTGC CATCCATTAT CCCTCATTCG ATCTGGATTC CTCCTACCAA 2820

CCCCAGATCT TCCATCATCG CCCTCCACCA GACTTTTCTC CACCACCGCC ACCTCCTGCC 2880

CAGGGTACAA CACCTTCAAA AGTAATCCGT CCCCCATCAT CCAAGATGAG TGACGACTCG 2940

GCCTATTCCG ATGGTGGATC GTCGTCCGTA CTCACCACGG AAGTCACACC GTCTGGAGCG 3000

ACTGTGCTTC GAATGGATTT GGGCAGAAAT CAACCGCCTA ACTATTGGCG AAATGTTTGA 3060

GCATGTGTCC CTGTAAATGT TTCCTCGAGA GAGATTTTTG CCGAGGTTGT GCGCTTCAGT 3120

CACGGTTTAT GACGATCCGG GTGCTTTTGC AATCATTTTG ATGTGTTCGA TTTGTTCTTC 3180

CTTGGTATCC AAGGGCTTTC ATCGTCTTCC GGACATTCTG TCACTTTTCT ACACTCTAAT 3240

GCTCCAACTG TCGTTAATAT CAGCATATCA TCGTCACAAT TATGCGCCAT TTTTTCTCAG 3300

ATTACCGGTT TCCTTTGTAC ATTTGTGGAT TGTAGTTGTA GCTAAACTGT AGCTATTCAG 3360

AGGTATTTTT GATCTAGTCG ATAATAGCGC AATATTGTTT TACTAATTAC TAAGTACTAA 3420

TTGTTTTTTT AAGTCCGATT CCTGCCTTCT ATGGAAAAAT TTTGTTTTCG TTTCCATCCC 3480

GTATCATACT TTTAGGTTGA GATCAATAAA AACGTAAAAT TTGAAAAAAA AAAAAAAAA 3539

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 986 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS:
(D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Haemonchus contortus

(vii) IMMEDIATE SOURCE:
(B) CLONE: PHC1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

Met Arg Asn Val Tyr Ile Leu Leu Leu Ser Val Val Gly Thr Phe Thr
1 5 10 15

Val Ala Glu Glu Leu Pro Ala Gln Ser Asn Ser Ser Ile Val Val Cys
20 25 30

Glu Gly Gly Thr Ala Glu Leu Glu Cys Pro His Gly Met Val Ile Ser
35 40 45

Ile Ala Leu Ala Asn Tyr Gly Arg Tyr Ser Ala Arg Val Cys Tyr Glu
50 55 60

Asn Glu Glu Leu Asp Asp Val Val Pro Met Thr Gln Cys His Asn Pro
65 70 75 80

Lys Thr Met Pro Thr Leu Arg Lys Ser Cys Asp Gly Arg Arg Glu Cys
85 90 95

His Phe Val Val Gly Asn Asp Phe Phe Val His Asp Pro Cys Pro Gly
100 105 110

Val Lys Lys Tyr Leu Glu Val Thr Tyr Leu Cys Val Ala Asp Val Thr
115 120 125

```
Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser
    130                 135                 140

Thr Thr Thr Glu Val Glu Asp Asp Val Lys Glu Asp Met Ser Ala Lys
145                 150                 155                 160

Ser Ala Pro Ser Thr Cys Ala Ala Thr Ser Arg Arg Gly Ile Glu Trp
                165                 170                 175

Pro Ala Thr Ile Ser Gly Thr Thr Val Asn Arg Pro Cys Pro Glu Gly
            180                 185                 190

Thr Arg Gly Thr Ser Ser Trp Lys Cys Ser Ala Glu Gly Leu Trp Ser
        195                 200                 205

Glu Pro Gly Pro Asn Thr Ile Glu Cys Arg Ser Asp Trp Thr Ile Gln
    210                 215                 220

Arg Gln Asp Ala Leu Glu Glu Thr Ile Lys Asp Gln Asp Ala Ser Gly
225                 230                 235                 240

Ile Pro Glu Leu Leu Arg Ala Met Thr Ser Asp Thr Arg Arg Pro Met
                245                 250                 255

Val Ala Gly Asp Leu Pro Lys Leu Leu Asn Ile Leu Asp Ile Val Gln
            260                 265                 270

Asp Val Val Gly Arg Glu Val Trp Ala Lys Ser Ser Gln Lys Leu Val
        275                 280                 285

Asn Gln Leu Ile Val Asn Val Val His Asn Ala Leu Arg Ala Lys Glu
    290                 295                 300

Met Trp Gln Asn Trp Pro Ser Val Lys Arg Gln Thr Phe Ala Thr Arg
305                 310                 315                 320

Leu Leu Asn Gly Val Glu Arg Ala Met Thr Ser Ser Ser Thr Thr Val
                325                 330                 335

Tyr Ser Ser Glu Asn Tyr Val Gln Pro Leu Val Met Thr Glu Met Ser
            340                 345                 350

Glu Ser Ile Arg Thr Ser Ser Gln Pro Ser Asn Tyr Phe Leu Phe Pro
        355                 360                 365

Ser Met Ala Leu Trp Ala Gly Glu Asn Asn Val Asp Ser Val Asp Val
    370                 375                 380

Pro Arg Glu Ala Leu Glu Met Thr Gly Leu Asp Arg Ala Arg Val Tyr
385                 390                 395                 400

Tyr Ala Ser Phe Ala Asn Ile Gly Glu Glu Met Glu Pro Pro Val Glu
                405                 410                 415

Ile Ser Ala Gly Ser Glu Gln Lys Pro Thr Gly Leu Glu Arg Arg Arg
```

```
            420                 425                 430

Arg Ile Val Ser Arg Val Val Ala Val Ser Leu Val Leu Asp Gly Lys
        435                 440                 445

Val Ile Arg Leu Pro Ile Leu Pro Lys Pro Ile Ile Ile Thr Phe His
    450                 455                 460

His Tyr Pro Glu Ala Leu Arg Arg Met Ser Ser Pro Glu Cys Ser Trp
465                 470                 475                 480

Trp Asp Thr Glu Asp Met Lys Trp Ser Thr Ser Gly Cys Ser Leu Gln
                485                 490                 495

Ser His Asn Ser Thr His Thr Val Cys Ala Cys Ser His Met Thr His
            500                 505                 510

Phe Ala Val Leu Met Asp Tyr Val Gly His Glu Ile Ser Ser Glu Asp
        515                 520                 525

Asn Gln Leu Leu Thr Phe Leu Thr Tyr Thr Gly Cys Thr Leu Ser Ile
    530                 535                 540

Val Cys Leu Thr Leu Thr Phe Phe Cys Phe Val Val Phe Ile Lys Gly
545                 550                 555                 560

Gly Gly Asp Arg Val Phe Ile His Lys Asn Leu Cys Ala Ser Leu Gly
                565                 570                 575

Ile Ala Glu Leu Val Phe Leu Ala Gly Ile Trp Arg Thr Glu Glu Lys
            580                 585                 590

Phe Glu Cys Gly Met Ile Ala Gly Cys Leu Leu Tyr Phe Phe Leu Ser
        595                 600                 605

Ala Leu Thr Trp Met Leu Leu Glu Gly Tyr Gln Leu Tyr Gln Met Leu
    610                 615                 620

Val Glu Val Phe Pro Ala Ser Arg Arg Arg Phe Thr Phe Phe Leu Val
625                 630                 635                 640

Gly Tyr Gly Leu Pro Ala Ile Ile Thr Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr Asp
                645                 650                 655

Pro Thr Gly Phe Gly Thr Arg Asn His Cys Trp Leu Arg Thr Asp Asn
            660                 665                 670

Leu Phe Ile Leu Phe Phe Val Ala Pro Ala Ala Val Ile Leu Leu Thr
        675                 680                 685

Asn Thr Met Phe Leu Phe Met Thr Met Cys Ile Val Tyr Arg His Ser
    690                 695                 700

Lys Tyr Ile Pro Cys Arg His Ala Ala Asp Asn Gly Gly Asp Ile Arg
705                 710                 715                 720
```

```
Thr Trp Val Lys Gly Ala Met Gly Leu Val Cys Leu Leu Gly Val Thr
                725                 730                 735

Trp Thr Cys Gly Leu Leu Trp Ile Asp Asp Gly His Ser Ile Val Met
            740                 745                 750

Ala Tyr Ala Phe Thr Ile Ala Asn Ser Leu Gln Gly Leu Phe Ile Phe
        755                 760                 765

Val Phe His Val Leu Cys Ser Glu Lys Met Arg Tyr Asp Ile Ala Arg
    770                 775                 780

Trp Cys Gly Lys His Gly Leu Ser Cys Ile Ser Ser Gly Ser Arg Asp
785                 790                 795                 800

Thr Ser Arg Asp Leu Gln Lys Arg Gly Thr Met Ser Pro Ser Glu Arg
                805                 810                 815

Ser Gly Ser Glu Phe Ile Tyr Pro Thr Ser Glu Lys Met His Thr Ser
            820                 825                 830

Pro Arg Gly Leu Glu Ser Ser Leu Ser Ser Ala Tyr Pro Gln Gln Pro
        835                 840                 845

Leu Ile His His Tyr Gln Arg Arg Pro Pro Gln Gln Pro Asn Gly Thr
    850                 855                 860

Tyr Asp Tyr Ala Thr Ile Ala Tyr Gly Glu Met Val Pro Gly His Met
865                 870                 875                 880

Leu Pro Arg Met Ala Ser Ser Phe Pro His Pro Gly Val Ala Ile His
                885                 890                 895

Tyr Pro Ser Phe Asp Leu Asp Ser Ser Tyr Gln Pro Gln Ile Phe His
            900                 905                 910

His Arg Pro Pro Pro Asp Phe Ser Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Gln
        915                 920                 925

Gly Thr Thr Pro Ser Lys Val Ile Arg Pro Pro Ser Ser Lys Met Ser
    930                 935                 940

Asp Asp Ser Ala Tyr Ser Asp Gly Gly Ser Ser Ser Val Leu Thr Thr
945                 950                 955                 960

Glu Val Thr Pro Ser Gly Ala Thr Val Leu Arg Met Asp Leu Gly Arg
                965                 970                 975

Asn Gln Pro Pro Asn Tyr Trp Arg Asn Val
            980                 985
```

Patentansprüche

1. Proteine, sowie Teilstücke dieser Proteine, die mit gegen parasitierende Nematoden wirkenden Stoffen aus der Gruppe der cyclischen oder offenkettigen Depsipeptide, die aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren bestehen, reagieren.

2. DNA-Sequenzen, die für Proteine bzw. für Teilstücke dieser Proteine kodieren, die mit gegen parasitierenden Nematoden wirkenden Stoffen aus der Gruppe der cyclischen oder offenkettigen Depsipeptide, die aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren bestehen, reagieren.

3. Proteine oder ihre Teilstücke, die mit gegen parasitierenden Nematoden wirkenden Stoffen aus der Gruppe der cyclischen oder offenkettigen Depsipeptide, die aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren bestehen, reagieren, zur Identifizierung von Stoffen mit Wirkung gegen parasitierende Nematoden aus der Gruppe der cyclischen oder offenkettigen Depsipeptide, die aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren bestehen.

4. Verfahren zur Identifizierung der Proteine und ihrer Teilstücke, die mit gegen parasitierenden Nematoden wirkenden Stoffen aus der Gruppe der cyclischen oder offenkettigen Depsipeptide, die aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren bestehen, reagieren, sowie die Herstellung der Proteine oder ihrer Teilstücke über rekombinante Technologie.

5. Protein, das mit gegen parasitierenden Nematoden wirkenden Stoffen aus der Gruppe der cyclischen oder offenkettigen Depsipeptide, die aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren bestehen, reagiert, isoliert aus einer parasitären Nematodenspezies, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Sequenz von 207 Aminosäuren aufweist und ein Molekulargewicht von 23.991g/mol besitzt.

6. Protein gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz gemäß Sequenzprotokoll ID Seq No. 2 aufweist.

7. Protein gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Transmembranregion, eine N-Glycosylierungsstelle, drei Determinanten sowie ein

Signalpeptid aufweist, die den folgenden Positionen und Sequenzen des Proteins in Sequenzprotokoll ID No. 2 entsprechen:

a) 1-18 NH_2-terminales Signalpeptid,
b) 174-190 eine Transmembranregion,
c) 69-75 eine antigene Determinante,
d) 157-162 eine antigene Determinante,
e) 159-164 eine antigene Determinante,
f) 167 eine Stelle für N-Glycosylierungen.

8. Protein, das mit gegen parasitierenden Nematoden wirkenden Stoffen aus der Gruppe der cyclischen oder offenkettigen Depsipeptide, die aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren bestehen, reagiert, isoliert aus einer parasitären Nematodenspezies, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Sequenz von 986 Aminosäuren aufweist und ein Molekulargewicht von 109.740 g/mol besitzt.

9. Protein gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz gemäß dem Sequenzprotokoll ID Seq. No. 4 aufweist.

10. Protein gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es fünf Transmembranregionen, drei N-Glycosylierungsstellen, drei Determinanten sowie ein Signalpeptid aufweist, die den folgenden Positionen und Sequenzen des Proteins in Sequenzprotokoll ID No. 4 entsprechen:

a) 1-18 NH_2-terminales Signalpeptid,
b) 531-562 erste Transmembrandomäne
c) 595-615 zweite Transmembrandomäne
d) 673-700 dritte Transmembrandomäne
e) 725-744 vierte Transmembrandomäne
f) 750-774 fünfte Transmembrandomäne
g) 26 eine Stelle für N-Glycosylierungen
h) 499 eine Stelle für N-Glycosylierungen
i) 862 eine Stelle für N-Glycosylierungen
j) 150-156 eine antigene Determinante
k) 428-434 eine antigene Determinante
l) 799-804 eine antigene Determinante

11. Verwendung des Proteins gemäß Anspruch 1 zur Unterscheidung von nematizid wirkenden cyclischen oder offenkettigen Depsipeptiden, bestehend aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren als Bausteine.

12. Testsysteme unter Verwendung der Proteine gemäß Anspruch 1 zur Identifizierung von nematizid wirkenden cyclischen oder offenkettigen Depsipeptiden, bestehend aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren als Bausteine.

13. Komplexe, bestehend aus einem cyclischen oder offenkettigen Depsipeptid, das aus Aminosäuren oder Hydroxycarbonsäuren besteht und geeigneten Liganden zur Erzeugung von Antikörpern gegen diese Depsipeptide.

14. Polyklonale oder monoklonale Antikörper gegen cyclische oder offenkettige Depsipeptide, bestehend aus Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren als Bausteine, hergestellt unter Verwendung der Komplexe gemäß Anspruch 10.

15. Verwendung der Antikörper gemäß Anspruch 11 als nematizide Wirkstoffe.

16. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die gesamte cDNA die Sequenz gemäß Sequenzprotokoll ID No. 1 aufweist.

17. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die gesamte cDNA die Sequenz gemäß Sequenzprotokoll ID No. 3 aufweist.

18. Rekombinant hergestellte DNA, die für die gesamte Aminosäuresequenz, Aminosäurepartialsequenzen, Analoga, Homologa, Derivate oder daraus resultierende Kombinationen der Aminosäuresequenz der Proteine gemäß Anspruch 1, kodiert und die gegebenenfalls in ein geeignetes Expressionssystem eingebaut ist.

19. Ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß man

a) einen nematiziden Wirkstoff aus der Gruppe der cyclischen oder offenkettigen Depsipeptide, bestehend aus Aminosäuren und

Hydroxycarbonsäuren als Bausteine, als Hapten mit einem Carriermolekül konjugiert,

b) ein Donor-Tier mittels geeigneter Applikation mit diesem Hapten-Carrier-Konjugat immunisiert,

c) die Spezifität der gebildeten Antikörper bestimmt,

d) gegebenenfalls die Konzentration der gebildeten spezifischen Antikörper bestimmt,

e) die aus Seren oder Antikörper produzierenden Lymphozyten gewonnenen spezifischen Antikörper abtrennt und gegebenenfalls reinigt.

20. Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß man als Carriermolekül makromolekulare Verbindungen verwendet, die frei zugängliche reaktive Gruppen für die Kupplungsreaktion mit offenkettigen oder cyclischen Depsipeptiden aufweisen und in der Lage sind, besagten Verbindungen eine immunogene Potenz zu verleihen.

21. Verfahren gemäß dem Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß man ein lysinreiches Protein mit einem Molekulargewicht zwischen 10.000 und 1.500.000 verwendet.

22. Ein Verfahren gemäß dem Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Protein auswählt aus der Gruppe bestehend aus "Bovine Serum Albumin" (BSA), "Keyhole Limpet Protein" (KLP), Humanes Serumalbumin (HSA), "Porcine Thyreoglobulin", B2 Microglobulin, Haemocyanin, Immunoglobuline; Toxine; Polysaccharide; Lipopolysaccharide; natürliche oder synthetische Polyadenyl- und Polyuridylsäuren; Polyalanyl- und Polylysin-Polypeptide; oder Zellmembrankomponenten verwendet.

Fig. 1

Translation of the nucleic acid sequence (pHC-2 DNA)

```
                10        20        30        40        50        60
                |         |         |         |         |         |
1   GTTTTTCACAATGAGGTTCATCACCTCATTGACGCTCCTGGCTTTGGTGACGATCACCTGC
                M  R  F  I  T  S  L  T  L  L  A  L  V  T  I  T  C   17

62  GGTATTCGTTTCCACGTACCCGCGAATAATAAGAAATGTATGAAAGAAGAAATTCATAAA
    G  I  R  F  H  V  P  A  N  N  K  K  C  M  K  E  E  I  H  K   37

122 AATATCGTTGTCACCGGTGAATACGAGTTCAGCGAAGGAATCGGCTATACAGGCAGTGTC
    N  I  V  V  T  G  E  Y  E  F  S  E  G  I  G  Y  T  G  S  V   57

182 CATGTGACAGACACACGAGGACATACGCTGTACAAACGGGAGAAGTTCAGCGATTTGAAG
    H  V  T  D  T  R  G  H  T  L  Y  K  R  E  K  F  S  D  L  K   77

242 GGGAAGTTCGCTTTCACAGCTGATGAGTACGACATTTTCGAAATCTGCATCAGTAATCAT
    G  K  F  A  F  T  A  D  E  Y  D  I  F  E  I  C  I  S  N  H   97

302 GCTCCTATTACGACAGGTCATGTACAACCCCGAGAAGTATCGTTGAAGATGAAACATGGA
    A  P  I  T  T  G  H  V  Q  P  R  E  V  S  L  K  M  K  H  G  117

362 GTCGAAGCGAAGAACTACGAAGATCTCGCCAAAGCAGAGCAGCTGAAGCCGCTTGAGGTC
    V  E  A  K  N  Y  E  D  L  A  K  A  E  Q  L  K  P  L  E  V  137

422 GAATTGCGACGTCTAGAAGATCTGTCTGATCAGATTGTGAAGGATTTCGCCTTCATGCGA
    E  L  R  R  L  E  D  L  S  D  Q  I  V  K  D  F  A  F  M  R  157

482 CAGCGAGAAGAGGAAATGAGAAACACAAACGAGTCCACAAACAGCCGTGTATTATACCTA
    Q  R  E  E  E  M  R  N  T  N  E  S  T  N  S  R  V  L  Y  L  177

542 TCAATTTTCTCTATGCTTTGTCTTCTGGCCTTGGCTATATGGCAGGTGATGTTCTTGCGC
    S  I  F  S  M  L  C  L  L  A  L  A  I  W  Q  V  M  F  L  R  197

602 AATTATTTCAAGGCAAAGAAGCTCATTGACTGAGCAGCTAGTCGGATTAGGTAGAAACGC
    N  Y  F  K  A  K  K  L  I  D  +                              207

662 GTGATTTTTTCCTTGATTTATGAAGTTAATTTTTCTGGGTGACTGCCATTCTTGTCTCAA

722 AGTTCCCGAAAATCGACTAGACTGTGGTTATCTATGGCACTACGTGTGATACGCTAACCT

782 TTTCTCTTTTTTAATGCGAGTCACCTGAATTTTGGCTAAATCTAGATGTGATGTTGCTGA

842 CTAATCTTGTTTGTACTCCGTAATGATGATGTGGGTAACATGGTTTAAGCTACCTTGTAC

902 TTATTATTTATTGTTGATGAATTCGTTATAATAAATTTGTTTCTTCCAAAAAAAAAAAAA

962 AAAAAAAAAAA
```

Fig. 2

Translation of a nucleic acid sequence

Done on DNA sequence PHC1FULL.
Total number of bases is: 3539.
Analysis done on the complete sequence.
Done on (absolute) phase(s): 1.
Using the Universal genetic code.

```
           10          20          30          40
TTC TGG CCG TCA TCG CCG TTG ATG CTG TCG CTT TCA GAA CGT CTC TTC

50          60          70          80          90
TAT TAC TAA TTC GAA AAT TGA CGT GAA TGA GCA GTT CGG TTT AAT ACC

  100         110         120         130         140
AAC ATG AGG AAT GTA TAT ATT CTT CTG CTA TCC GTC GTT GGG ACG TTT
    MET Arg Asn Val Tyr Ile Leu Leu Leu Ser Val Val Gly Thr Phe

    150         160         170         180         190
ACC GTC GCA GAA GAA TTG CCA GCT CAA TCA AAC AGT TCC ATT GTA GTA
Thr Val Ala Glu Glu Leu Pro Ala Gln Ser Asn Ser Ser Ile Val Val

       200         210         220         230         240
TGC GAA GGT GGT ACA GCC GAA TTG GAA TGT CCC CAT GGT ATG GTC ATT
Cys Glu Gly Gly Thr Ala Glu Leu Glu Cys Pro His Gly MET Val Ile

          250         260         270         280
TCA ATA GCT CTG GCA AAT TAT GGC CGA TAT TCG GCT CGG GTT TGC TAC
Ser Ile Ala Leu Ala Asn Tyr Gly Arg Tyr Ser Ala Arg Val Cys Tyr

290         300         310         320         330
GAG AAC GAG GAA CTG GAC GAT GTG GTA CCG ATG ACT CAA TGC CAT AAC
Glu Asn Glu Glu Leu Asp Asp Val Val Pro MET Thr Gln Cys His Asn

  340         350         360         370         380
CCT AAA ACG ATG CCG ACC CTT AGG AAA AGT TGT GAT GGA CGT CGT GAA
Pro Lys Thr MET Pro Thr Leu Arg Lys Ser Cys Asp Gly Arg Arg Glu

    390         400         410         420         430
TGT CAT TTT GTG GTT GGT AAC GAC TTC TTC GTA CAT GAT CCA TGC CCA
Cys His Phe Val Val Gly Asn Asp Phe Phe Val His Asp Pro Cys Pro

       440         450         460         470         480
GGA GTG AAG AAA TAC CTT GAA GTC ACA TAT CTG TGT GTT GCT GAT GTG
Gly Val Lys Lys Tyr Leu Glu Val Thr Tyr Leu Cys Val Ala Asp Val
```

```
                490                 500                 510                 520
ACT ACC ACA ACA ACC ACT ACG ACG ACG ACC ACC ACC ACT ACC ACT ACA
Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr

530                 540                 550                 560                 570
TCC ACC ACA ACA GAG GTG GAG GAT GAT GTT AAA GAA GAT ATG AGC GCG
Ser Thr Thr Thr Glu Val Glu Asp Asp Val Lys Glu Asp MET Ser Ala

  580                 590                 600                 610                 620
AAA TCT GCA CCA TCG ACG TGT GCA GCG ACT TCG AGA AGA GGA ATC GAA
Lys Ser Ala Pro Ser Thr Cys Ala Ala Thr Ser Arg Arg Gly Ile Glu

    630                 640                 650                 660                 670
TGG CCT GCG ACC ATT TCT GGG ACG ACG GTG AAC CGG CCA TGT CCC GAA
Trp Pro Ala Thr Ile Ser Gly Thr Thr Val Asn Arg Pro Cys Pro Glu

      680                 690                 700                 710                 720
GGC ACG AGA GGC ACG TCC TCA TGG AAA TGT TCC GCC GAG GGG CTG TGG
Gly Thr Arg Gly Thr Ser Ser Trp Lys Cys Ser Ala Glu Gly Leu Trp

                730                 740                 750                 760
TCT GAA CCT GGT CCA AAT ACA ATA GAG TGT CGC AGT GAT TGG ACC ATT
Ser Glu Pro Gly Pro Asn Thr Ile Glu Cys Arg Ser Asp Trp Thr Ile

770                 780                 790                 800                 810
CAG CGG CAG GAT GCT CTT GAA GAG ACG ATA AAA GAT CAG GAT GCA AGC
Gln Arg Gln Asp Ala Leu Glu Glu Thr Ile Lys Asp Gln Asp Ala Ser

  820                 830                 840                 850                 860
GGA ATT CCG GAG CTT CTT CGA GCG ATG ACG TCT GAT ACC CGA AGA CCT
Gly Ile Pro Glu Leu Leu Arg Ala MET Thr Ser Asp Thr Arg Arg Pro

    870                 880                 890                 900                 910
ATG GTA GCT GGT GAT TTG CCA AAA CTT CTA AAC ATT CTT GAC ATC GTT
MET Val Ala Gly Asp Leu Pro Lys Leu Leu Asn Ile Leu Asp Ile Val

      920                 930                 940                 950                 960
CAA GAT GTT GTT GGC AGA GAA GTG TGG GCA AAA AGT AGC CAG AAG TTG
Gln Asp Val Val Gly Arg Glu Val Trp Ala Lys Ser Ser Gln Lys Leu

                970                 980                 990                1000
GTG AAC CAG CTT ATT GTG AAT GTC GTA CAT AAT GCC CTT CGA GCG AAG
Val Asn Gln Leu Ile Val Asn Val Val His Asn Ala Leu Arg Ala Lys

1010                1020                1030                1040                1050
GAA ATG TGG CAG AAC TGG CCG TCA GTG AAG CGT CAA ACT TTC GCC ACA
Glu MET Trp Gln Asn Trp Pro Ser Val Lys Arg Gln Thr Phe Ala Thr
```

```
   1060          1070          1080          1090          1100
AGA CTT TTG AAT GGT GTT GAA CGA GCC ATG ACC TCC TCC TCA ACA ACT
Arg Leu Leu Asn Gly Val Glu Arg Ala MET Thr Ser Ser Ser Thr Thr

   1110          1120          1130          1140          1150
GTC TAT TCG TCT GAG AAC TAT GTG CAA CCG TTG GTG ATG ACA GAG ATG
Val Tyr Ser Ser Glu Asn Tyr Val Gln Pro Leu Val MET Thr Glu MET

      1160          1170          1180          1190          1200
AGC GAA AGC ATT CGG ACT TCT TCG CAA CCA TCG AAC TAC TTC CTA TTC
Ser Glu Ser Ile Arg Thr Ser Ser Gln Pro Ser Asn Tyr Phe Leu Phe

          1210          1220          1230          1240
CCT TCA ATG GCC TTG TGG GCT GGT GAA AAT AAC GTG GAT AGC GTT GAC
Pro Ser MET Ala Leu Trp Ala Gly Glu Asn Asn Val Asp Ser Val Asp

1250          1260          1270          1280          1290
GTT CCA AGG GAA GCT CTC GAA ATG ACA GGA TTG GAC CGT GCC CGA GTC
Val Pro Arg Glu Ala Leu Glu MET Thr Gly Leu Asp Arg Ala Arg Val

   1300          1310          1320          1330          1340
TAC TAT GCG TCT TTT GCG AAC ATT GGT GAG GAA ATG GAA CCT CCG GTG
Tyr Tyr Ala Ser Phe Ala Asn Ile Gly Glu Glu MET Glu Pro Pro Val

   1350          1360          1370          1380          1390
GAG ATA TCA GCA GGA TCT GAA CAG AAG CCG ACT GGA CTA GAA AGA CGT
Glu Ile Ser Ala Gly Ser Glu Gln Lys Pro Thr Gly Leu Glu Arg Arg

      1400          1410          1420          1430          1440
CGC CGA ATT GTT TCA CGT GTG GTG GCC GTG TCG CTT GTT CTC GAT GGC
Arg Arg Ile Val Ser Arg Val Val Ala Val Ser Leu Val Leu Asp Gly

          1450          1460          1470          1480
AAA GTC ATA AGG CTA CCA ATA CTT CCT AAG CCG ATC ATC ATC ACA TTC
Lys Val Ile Arg Leu Pro Ile Leu Pro Lys Pro Ile Ile Ile Thr Phe

1490          1500          1510          1520          1530
CAT CAT TAC CCT GAG GCT TTA CGG CGG ATG TCC TCA CCT GAA TGT TCT
His His Tyr Pro Glu Ala Leu Arg Arg MET Ser Ser Pro Glu Cys Ser

   1540          1550          1560          1570          1580
TGG TGG GAT ACT GAA GAC ATG AAG TGG TCT ACA AGT GGA TGC TCC CTA
Trp Trp Asp Thr Glu Asp MET Lys Trp Ser Thr Ser Gly Cys Ser Leu

   1590          1600          1610          1620          1630
CAA TCG CAT AAT TCT ACT CAT ACC GTA TGC GCT TGT AGT CAT ATG ACT
Gln Ser His Asn Ser Thr His Thr Val Cys Ala Cys Ser His MET Thr
```

```
      1640        1650        1660        1670        1680
CAC TTT GCC GTT TTG ATG GAT TAT GTC GGT CAT GAG ATT TCC TCC GAG
His Phe Ala Val Leu MET Asp Tyr Val Gly His Glu Ile Ser Ser Glu

         1690        1700        1710        1720
GAT AAT CAG CTT CTT ACA TTT CTC ACA TAT ACC GGT TGC ACG CTG TCA
Asp Asn Gln Leu Leu Thr Phe Leu Thr Tyr Thr Gly Cys Thr Leu Ser

1730        1740        1750        1760        1770
ATA GTC TGC CTT ACT CTG ACA TTC TTC TGT TTT GTT GTC TTC ATC AAA
Ile Val Cys Leu Thr Leu Thr Phe Phe Cys Phe Val Val Phe Ile Lys

 1780        1790        1800        1810        1820
GGA GGA GGC GAT AGG GTT TTC ATT CAT AAA AAT CTC TGC GCT TCT CTT
Gly Gly Gly Asp Arg Val Phe Ile His Lys Asn Leu Cys Ala Ser Leu

   1830        1840        1850        1860        1870
GGT ATA GCC GAA CTG GTG TTC CTC GCT GGA ATT TGG AGG ACA GAA GAA
Gly Ile Ala Glu Leu Val Phe Leu Ala Gly Ile Trp Arg Thr Glu Glu

      1880        1890        1900        1910        1920
AAG TTT GAA TGC GGT ATG ATC GCT GGT TGC CTC CTT TAT TTC TTT CTA
Lys Phe Glu Cys Gly MET Ile Ala Gly Cys Leu Leu Tyr Phe Phe Leu

         1930        1940        1950        1960
TCG GCT TTA ACC TGG ATG TTA CTC GAG GGC TAC CAG CTT TAC CAG ATG
Ser Ala Leu Thr Trp MET Leu Leu Glu Gly Tyr Gln Leu Tyr Gln MET

1970        1980        1990        2000        2010
CTT GTT GAG GTG TTC CCT GCC TCG CGA CGT CGA TTC ACC TTT TTC CTT
Leu Val Glu Val Phe Pro Ala Ser Arg Arg Arg Phe Thr Phe Phe Leu

 2020        2030        2040        2050        2060
GTT GGC TAT GGC CTG CCA GCT ATC ATT ACT GGA GCA GCC GCT TAT TAC
Val Gly Tyr Gly Leu Pro Ala Ile Ile Thr Gly Ala Ala Ala Tyr Tyr

   2070        2080        2090        2100        2110
GAC CCG ACT GGT TTT GGA ACA CGC AAT CAT TGC TGG TTA CGC ACC GAC
Asp Pro Thr Gly Phe Gly Thr Arg Asn His Cys Trp Leu Arg Thr Asp

      2120        2130        2140        2150        2160
AAC CTT TTC ATT TTA TTC TTT GTC GCA CCA GCA GCT GTG ATT TTA CTG
Asn Leu Phe Ile Leu Phe Phe Val Ala Pro Ala Ala Val Ile Leu Leu

         2170        2180        2190        2200
ACG AAT ACG ATG TTC CTG TTC ATG ACT ATG TGC ATT GTA TAC AGA CAT
Thr Asn Thr MET Phe Leu Phe MET Thr MET Cys Ile Val Tyr Arg His
```

```
2210          2220          2230          2240          2250
TCG AAG TAT ATC CCC TGT AGG CAT GCT GCG GAT AAT GGA GGT GAC ATA
Ser Lys Tyr Ile Pro Cys Arg His Ala Ala Asp Asn Gly Gly Asp Ile

 2260          2270          2280          2290          2300
AGG ACT TGG GTC AAA GGA GCG ATG GGT CTG GTC TGT CTA CTT GGT GTC
Arg Thr Trp Val Lys Gly Ala MET Gly Leu Val Cys Leu Leu Gly Val

   2310          2320          2330          2340          2350
ACA TGG ACT TGT GGC CTT CTC TGG ATC GAT GAT GGC CAT TCG ATA GTG
Thr Trp Thr Cys Gly Leu Leu Trp Ile Asp Asp Gly His Ser Ile Val

       2360          2370          2380          2390          2400
ATG GCA TAC GCG TTT ACC ATT GCG AAT TCC CTT CAG GGT CTT TTC ATC
MET Ala Tyr Ala Phe Thr Ile Ala Asn Ser Leu Gln Gly Leu Phe Ile

          2410          2420          2430          2440
TTT GTC TTC CAT GTG CTC TGC TCA GAG AAG ATG CGT TAC GAT ATT GCC
Phe Val Phe His Val Leu Cys Ser Glu Lys MET Arg Tyr Asp Ile Ala

2450          2460          2470          2480          2490
CGA TGG TGT GGC AAG CAT GGC CTT TCA TGT ATC AGC TCT GGC TCC CGT
Arg Trp Cys Gly Lys His Gly Leu Ser Cys Ile Ser Ser Gly Ser Arg

 2500          2510          2520          2530          2540
GAT ACC TCT AGG GAT CTA CAA AAA CGT GGA ACT ATG TCA CCG TCG GAG
Asp Thr Ser Arg Asp Leu Gln Lys Arg Gly Thr MET Ser Pro Ser Glu

   2550          2560          2570          2580          2590
AGG AGT GGC AGC GAA TTC ATC TAT CCC ACA TCG GAG AAG ATG CAC ACA
Arg Ser Gly Ser Glu Phe Ile Tyr Pro Thr Ser Glu Lys MET His Thr

       2600          2610          2620          2630          2640
TCT CCT CGT GGA TTG GAA TCC TCT CTC AGC TCG GCC TAT CCT CAA CAA
Ser Pro Arg Gly Leu Glu Ser Ser Leu Ser Ser Ala Tyr Pro Gln Gln

          2650          2660          2670          2680
CCA CTC ATC CAC CAC TAT CAG CGT CGT CCA CCG CAA CAG CCT AAT GGA
Pro Leu Ile His His Tyr Gln Arg Arg Pro Pro Gln Gln Pro Asn Gly

2690          2700          2710          2720          2730
ACT TAT GAC TAC GCA ACA ATT GCG TAT GGC GAG ATG GTA CCA GGC CAT
Thr Tyr Asp Tyr Ala Thr Ile Ala Tyr Gly Glu MET Val Pro Gly His

 2740          2750          2760          2770          2780
ATG TTA CCA CGC ATG GCC TCC TCG TTT CCT CAT CCA GGT GTT GCC ATC
MET Leu Pro Arg MET Ala Ser Ser Phe Pro His Pro Gly Val Ala Ile
```

```
    2790          2800          2810          2820          2830
CAT TAT CCC TCA TTC GAT CTG GAT TCC TCC TAC CAA CCC CAG ATC TTC
His Tyr Pro Ser Phe Asp Leu Asp Ser Ser Tyr Gln Pro Gln Ile Phe

      2840          2850          2860          2870          2880
CAT CAT CGC CCT CCA CCA GAC TTT TCT CCA CCA CCG CCA CCT CCT GCC
His His Arg Pro Pro Pro Asp Phe Ser Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala

          2890          2900          2910          2920
CAG GGT ACA ACA CCT TCA AAA GTA ATC CGT CCC CCA TCA TCC AAG ATG
Gln Gly Thr Thr Pro Ser Lys Val Ile Arg Pro Pro Ser Ser Lys MET

2930          2940          2950          2960          2970
AGT GAC GAC TCG GCC TAT TCC GAT GGT GGA TCG TCG TCC GTA CTC ACC
Ser Asp Asp Ser Ala Tyr Ser Asp Gly Gly Ser Ser Ser Val Leu Thr

 2980          2990          3000          3010          3020
ACG GAA GTC ACA CCG TCT GGA GCG ACT GTG CTT CGA ATG GAT TTG GGC
Thr Glu Val Thr Pro Ser Gly Ala Thr Val Leu Arg MET Asp Leu Gly

   3030          3040          3050          3060          3070
AGA AAT CAA CCG CCT AAC TAT TGG CGA AAT GTT TGA GCA TGT GTC CCT
Arg Asn Gln Pro Pro Asn Tyr Trp Arg Asn Val ---

      3080          3090          3100          3110          3120
GTA AAT GTT TCC TCG AGA GAG ATT TTT GCC GAG GTT GTG CGC TTC AGT

          3130          3140          3150          3160
CAC GGT TTA TGA CGA TCC GGG TGC TTT TGC AAT CAT TTT GAT GTG TTC

3170          3180          3190          3200          3210
GAT TTG TTC TTC CTT GGT ATC CAA GGG CTT TCA TCG TCT TCC GGA CAT

 3220          3230          3240          3250          3260
TCT GTC ACT TTT CTA CAC TCT AAT GCT CCA ACT GTC GTT AAT ATC AGC

   3270          3280          3290          3300          3310
ATA TCA TCG TCA CAA TTA TGC GCC ATT TTT TCT CAG ATT ACC GGT TTC

      3320          3330          3340          3350          3360
CTT TGT ACA TTT GTG GAT TGT AGT TGT AGC TAA ACT GTA GCT ATT CAG

          3370          3380          3390          3400
AGG TAT TTT TGA TCT AGT CGA TAA TAG CGC AAT ATT GTT TTA CTA ATT

3410          3420          3430          3440          3450
ACT AAG TAC TAA TTG TTT TTT TAA GTC CGA TTC CTG CCT TCT ATG GAA
```

```
3460        3470        3480        3490        3500
AAA TTT TGT TTT CGT TTC CAT CCC GTA TCA TAC TTT TAG GTT GAG ATC

  3510        3520        3530
AAT AAA AAC GTA AAA TTT GAA AAA AAA AAA AAA AA
```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/EP 97/05314

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/12 C07K14/435 C07K16/18 C07K16/44 A61K39/395
G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K C12N A61K G01N C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RAYBOULD T. ET AL.: "An enzyme immunoassay for determining plasma concentrations of didemnin B" JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSIS, vol. 6, 1992, pages 136-142, XP002052915 see the whole document ---	13,14, 19-22
A	CULLY D. AND PARESS P.: "Solubilization and characterization of a high affinity ivermectin binding site from Caenorhabditis elegans" MOLECULAR PHARMACOLOGY, vol. 40, no. 2, August 1991, pages 326-332, XP002052916 see the whole document --- -/--	1-22

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

7

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 January 1998	20.02.98
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Kania, T

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten nal Application No
PCT/EP 97/05314

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 634 408 A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO) 18 January 1995 cited in the application see the whole document	1-22
A	WO 94 02169 A (PITMAN MOORE INC ;SMITH WILLIAM DAVID (GB); SMITH STUART KEVIN (GB) 3 February 1994 see the whole document	1-22
A	WO 95 12679 A (BIOTECH & BIOLOG SCIEN RES ;SMITH TREVOR STANLEY (GB); SMITH FIONA) 11 May 1995 see the whole document	1-22

7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ep 97/05314

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claim 15 refers to a method for the treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the indicated effects of the compound/composition.

2. [X] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See Supplemental Sheet Additional Matter PCT/ISA/210

3. [] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/EP 97/05314

Claim Number: 15

According to its wording, Claim 15 could not be searched independently from Claim 11. For this reason, the search was carried out in accordance with the Description on page 22, lines 23-25 of the present Application, that is to say, the Claim was interpreted as follows: "Use of antibodies against the inventive proteins as nematicidal active substances".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Intern nal Application No
PCT/EP 97/05314

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0634408 A	18-01-1995	AU	669883 B	27-06-1996
		AU	3648393 A	21-10-1993
		US	5514773 A	07-05-1996
		CN	1080932 A	19-01-1994
		WO	9319053 A	30-09-1993
		NZ	249588 A	27-08-1996
WO 9402169 A	03-02-1994	AT	134878 T	15-03-1996
		AU	675443 B	06-02-1997
		AU	4579993 A	14-02-1994
		CN	1088217 A	22-06-1994
		CZ	9500144 A	13-09-1995
		DE	69301733 D	11-04-1996
		DE	69301733 T	31-10-1996
		EP	0652769 A	17-05-1995
		ES	2085163 T	16-05-1996
		FI	950248 A	20-01-1995
		HU	70985 A	28-11-1995
		IL	106407 A	30-09-1997
		JP	7509698 T	26-10-1995
		NO	950211 A	20-01-1995
		NZ	254210 A	26-11-1996
		PL	307170 A	15-05-1995
		ZA	9305281 A	15-04-1994
		ZW	8893 A	01-06-1994
WO 9512679 A	11-05-1995	AU	8064894 A	23-05-1995
		ZA	9408729 A	10-07-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern ales Aktenzeichen
PCT/EP 97/05314

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/12 C07K14/435 C07K16/18 C07K16/44 A61K39/395
G01N33/53

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K C12N A61K G01N C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	RAYBOULD T. ET AL.: "An enzyme immunoassay for determining plasma concentrations of didemnin B" JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSIS, Bd. 6, 1992, Seiten 136-142, XP002052915 siehe das ganze Dokument ---	13,14, 19-22
A	CULLY D. AND PARESS P.: "Solubilization and characterization of a high affinity ivermectin binding site from Caenorhabditis elegans" MOLECULAR PHARMACOLOGY, Bd. 40, Nr. 2, August 1991, Seiten 326-332, XP002052916 siehe das ganze Dokument --- -/--	1-22

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
22.Januar 1998	20.02.98
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	**Bevollmächtigter Bediensteter** Kania, T

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern ales Aktenzeichen
PCT/EP 97/05314

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 634 408 A (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO) 18.Januar 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-22
A	WO 94 02169 A (PITMAN MOORE INC ;SMITH WILLIAM DAVID (GB); SMITH STUART KEVIN (GB) 3.Februar 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-22
A	WO 95 12679 A (BIOTECH & BIOLOG SCIEN RES ;SMITH TREVOR STANLEY (GB); SMITH FIONA) 11.Mai 1995 siehe das ganze Dokument -----	1-22

7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. ationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/05314

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. [X] Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Obwohl Anspruch 15 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

2. [X] Ansprüche Nr. 15
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

3. [] Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. [] Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.

2. [] Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. [] Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. [] Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

[] Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

[] Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN PCT/ISA/ 210

Ansprüche Nr.: 15

Anspruch 15 konnte, gemäss seines Wortlauts, in Abhängigkeit von Anspruch 11 nicht recherchiert werden. Daher wurde die Recherche entsprechend der Beschreibung auf Seite 22, Zeilen 23-25 der vorliegenden Anmeldung durchgeführt, das heisst der Anspruch wurde wie folgt interpretiert: "Verwendung von Antikörpern gegen die erfindungsgemässen Proteine als nematizide Werkstoffe".

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern ales Aktenzeichen
PCT/EP 97/05314

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0634408 A	18-01-1995	AU 669883 B	27-06-1996
		AU 3648393 A	21-10-1993
		US 5514773 A	07-05-1996
		CN 1080932 A	19-01-1994
		WO 9319053 A	30-09-1993
		NZ 249588 A	27-08-1996
WO 9402169 A	03-02-1994	AT 134878 T	15-03-1996
		AU 675443 B	06-02-1997
		AU 4579993 A	14-02-1994
		CN 1088217 A	22-06-1994
		CZ 9500144 A	13-09-1995
		DE 69301733 D	11-04-1996
		DE 69301733 T	31-10-1996
		EP 0652769 A	17-05-1995
		ES 2085163 T	16-05-1996
		FI 950248 A	20-01-1995
		HU 70985 A	28-11-1995
		IL 106407 A	30-09-1997
		JP 7509698 T	26-10-1995
		NO 950211 A	20-01-1995
		NZ 254210 A	26-11-1996
		PL 307170 A	15-05-1995
		ZA 9305281 A	15-04-1994
		ZW 8893 A	01-06-1994
WO 9512679 A	11-05-1995	AU 8064894 A	23-05-1995
		ZA 9408729 A	10-07-1995